



Mara Sofia Sousa Fernandes

**Análise de compostos voláteis do malte por “*Headspace*” –
microextração em fase sólida acoplada ao GC-MS:
Quantificação do dimetilsulfureto**

**Dissertação do 2º ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em
Controlo de Qualidade na Especialidade De Água e Alimentos**

Orientadora:

Professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira

Co-orientadora

Doutora Sara Cristina da Silva Cunha

Outubro 2014

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO
APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE
DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE
COMPROMETE.

Comunicações

Da realização deste trabalho resultaram as seguintes comunicações:

- **M. Fernandes**, S. Cunha, S. Meireles, T. Brandão and I.M.P.L.V.O. Ferreira; “Analysis of malt volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled with GC-MS” Sessão pública de apresentação dos projetos de investigação científica, Reitoria da Universidade do Porto (IJUP), em 13 de Fevereiro de 2014 (comunicação oral).
- O. Viegas, **M. Fernandes**, S. Cunha, S. Meireles, T. Brandão, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira; “Furanic compounds in spealty malts and diferente beer styles.” 1st international conference on food safety from experience to prespectives, junho 2014 (comunicação oral).
- **M. Fernandes**, S. Cunha, I.M.P.L.V.O. Ferreira; “Quantificação do dimetilsulfureto no malte por microextração em fase sólida em “*headspace*” acoplada a GC-MS” XX Encontro Luso-Galego de Química, Novembro 2014 (submetido para comunicação oral).

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e estímulo de diversas pessoas, o que deste modo me leva a expressar toda a minha gratidão a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização desta dissertação. Deste modo quero manifestar os meus agradecimentos aos meus pais, João Fernandes e Lília Fernandes e às minhas irmãs Marta Fernandes e Letícia Fernandes, pois sem eles esta jornada teria sido impossível.

À minha orientadora professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira, por toda a força, apoio, amabilidade e paciência durante esta fase.

À minha co-orientadora Doutora Sara Cristina da Silva Cunha, por todo o apoio e dedicação.

À empresa cervejeira Unicer-Bebidas de Portugal SGPS, por ter proporcionado a possibilidade de realização deste projeto.

Aos laboratórios de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pelas condições disponibilizadas para a realização deste trabalho.

Ao José Santos por estar sempre ao meu lado e me ter apoiado durante todo o mestrado.

E às minhas colegas e amigas (Bárbara Viana, Sandra Calhau, Joana Rey, Mariana Santos, Catarina Carvalho, Ivone Sá, Filipa Campos...) que me acompanharam e estiveram sempre a meu lado durante esta fase. E a todos os meus colegas deste mestrado.

A todos um muito obrigado por terem estado comigo nesta árdua e magnífica experiência.

Resumo

No processo de fabrico da cerveja são várias as matérias-primas usadas, porém o malte exerce um papel fundamental neste processo. Além de conferir aromas e sabores característicos para a cerveja, possibilita o processo de fermentação alcoólica. O malte é obtido através da cevada pelo processo denominado de maltagem. Este processo inclui 3 etapas, a molha, a germinação e a estufagem e/ou torra. Diferentes tipos de malte podem ser produzidos, dependendo da temperatura a que é submetido na terceira etapa.

No presente estudo efetuou-se a avaliação do perfil de voláteis de diferentes tipos de malte, a avaliação das condições de maltagem, especialmente da temperatura de estufagem na fração volátil e a avaliação da composição em dimetilsulfureto (DMS) do malte *pilsen*. Para tal otimizou-se duas técnicas de microextração em fase sólida em *headspace* (HS-SPME) usando uma fibra Carboxeno-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS), seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Foram estudados 2 lotes de 4 tipos diferentes de maltes industriais, incluindo o malte *pilsen*, de trigo, caramelo e chocolate. Foram ainda estudados 7 lotes de malte *pilsen* produzido à escala piloto numa minimaltaria, utilizando condições de maltagem controladas e 2 variedades de cevada (*Quench* e *Tipple*).

Nos maltes industriais verificou-se que os álcoois e os aldeídos eram os voláteis predominantes nas variedades *pilsen* e trigo e os compostos furânicos eram predominantes nas variedades caramelo e chocolate. Pela análise do perfil de voláteis dos 7 lotes de malte provenientes da minimaltaria, verificou-se que o malte das duas variedades de cevada (*Quench* e *Tipple*) apresentou um perfil qualitativo de voláteis semelhante no que respeita aos compostos com maior impacto no *flavour*, os aldeídos, as cetonas e os álcoois. Verificaram-se diferenças quantitativas no perfil de voláteis dependendo da temperatura de estufagem do malte. No entanto, a evolução foi semelhante do início para o fim da estufagem, os aldeídos aumentaram, diminuindo ligeiramente no malte final e os álcoois diminuíram do início para o fim da estufagem e depois aumentaram ligeiramente no malte final. As cetonas identificadas nos 2 tipos de malte foram as mesmas e no geral, não apresentaram diferenças significativas ao longo da maltagem.

O teor de DMS nas amostras de malte *pilsen* provenientes da minimaltaria variou entre 150 – 3810 µg/kg. Verificaram-se grandes oscilações na composição em DMS ao longo da estufagem. No entanto, no geral, os lotes de malte com temperaturas mais baixas de estufagem apresentaram teores mais elevados de DMS o que pode comprometer a qualidade do malte.

Palavras-chave: Malte, perfil de voláteis, minimaltaria, dimetilsulfureto, GC-MS.

Abstract

In brewing beer process various raw materials can be used, but malt plays a fundamental role in this process. Besides conferring characteristic aromas and flavours to beer, malt also enable the alcoholic fermentation. Malt barley is obtained by a process known as malting. This process includes three steps, the wet, germination and baking and / or roasting. Different types of malt may be produced, depending on the temperature they are subjected in the third step.

In this study was performed the volatile profile of different malt types, assessment the malting conditions, especially the evolution of stuffing temperature in the volatile fraction and assessment the composition of dimethyl sulfide (DMS) in pilsen malt. Thus, two techniques of solid phase microextraction in headspace (HS-SPME) using a fiber-Carboxeno polydimethylsiloxane (PDMS-CAR) followed by analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) were optimized. Two batches of four different types of industrial malts, including lager malt, wheat, caramel and chocolate were studied. Additionally, 7 lots of pilsen malt produced at pilot scale in a micro malting plant using controlled conditions and 2 barley varieties (Quench e Tipple) were also studied.

In the industrial malts it was found that the alcohols and aldehydes were predominant volatiles in pilsen and wheat malts and furan compounds were predominant in caramel and chocolate malts. In the analysis of volatile profile of 7 lots of malt from the micro malting plant, it was found that the malt from the two barley varieties (Tipple and quench) showed similar qualitative profile with respect to the volatile compounds that have greater flavor impact, the aldehydes, ketones and alcohols. There were quantitative differences in the volatile profile depending on the temperature of malt curing. However, the pattern was similar from the beginning to the end of curing, the aldehydes increased, decreasing slightly in the finished malt and the alcohols decreased from the start to the end of curing and then increased slightly in the finished malt. Ketones identified in two types of malt were the same and in general, no significant differences were observed along the malting.

The content of DMS pilsen malt from micro malting plant ranged from 150 to 3810 mg/kg. There were large variations in composition of DMS along the curing. However, in general, the lots of malt with lower curing temperatures had higher levels of DMS which can compromise the quality of the malt.

Key words: Malt, volatile compounds, micro malting, dimethyl sulfide, GC-MS.

Índice

Comunicações	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Abreviaturas	xii
1. Introdução e objetivos	13
1.1 Grãos de cevada	15
1.1.1 Variedades de cevada.....	16
1.2. Obtenção do malte	17
1.2.1 Reações de <i>Maillard</i>	20
1.2.2 Tipos de malte	21
1.2.2.1 Malte <i>Pilsen</i>	21
1.2.2.2 Malte de Trigo	22
1.2.2.3 Malte Caramelo	22
1.2.2.4 Malte Chocolate	22
1.2.2.5 Malte Cristal	23
1.3. Compostos voláteis do malte	23
1.4 Obtenção da cerveja	30
1.5 Análise por SPME-GC-MS de compostos voláteis	39
1.5.1 Cromatografia gasosa	39
1.5.1.1 Caraterização de um cromatógrafo gasoso	39
1.5.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)	41
1.5.3 Análise por “ <i>Headspace</i> ” – microextração em fase sólida (HS-SPME).....	41
1.6 Objetivos do trabalho	44
2. Materiais e métodos	45
2.1 Amostragem	47

2.2	Materiais e reagentes.....	49
2.2.1	Materiais	49
2.3	Preparação da amostra	50
2.3.1	Preparação da amostra para a análise de compostos voláteis do malte.....	50
2.3.2	Preparação da amostra para a quantificação do DMS	50
2.4	Cromatografia gasosa com deteção de massa	51
2.4.2	Condições cromatográficas para a quantificação do DMS	53
2.5	Avaliação da eficácia analítica	56
2.6	Análise estatística dos resultados obtidos com GC-MS.....	57
3.	 Resultados e discussão	59
3.1	Otimização das condições de extração dos compostos voláteis	61
3.1.1	Otimização das condições para avaliar o perfil de voláteis.....	61
3.1.2	Otimização das condições para a quantificação do DMS	65
3.2	Perfil de voláteis em amostras de malte especiais.....	69
3.2.1	Maltes industriais 1º lote	69
3.2.2	Maltes industriais 2º lote	71
3.3	Malte <i>pilsen</i> proveniente da minimaltaria.	76
3.3.1	Perfil de voláteis	76
3.3.1.1	Variedade <i>Quench</i>	76
3.3.1.2	Variedade <i>Tipple</i>	79
3.3.2	Análise estatística do perfil de voláteis do malte <i>pilsen</i> proveniente da minimaltaria.....	86
3.3.2.1	Variedade <i>Quench</i>	86
3.3.2.2	Variedade <i>Tipple</i>	93
3.4	Quantificação do DMS nas amostras de malte <i>pilsen</i> provenientes da minimaltaria	101
4.	 Conclusões.....	107
5.	 Bibliografia e mediografia.....	111

Índice de figuras

Figura 1- Morfologia de um grão de cevada, adaptado de http://veja.abril.com.br/ , 29/04/2014 ...	15
Figura 2 - Desenvolvimento germinativo de um grão de cevada, adaptado, de http://pt.malteurop.com 30/04/2014.	18
Figura 3- Do malte à cerveja, disponível em http://pt.malteurop.com , 30/04/2014.	31
Figura 4- Morfologia do lúpulo, adaptado de http://www.gruit.es ; http://comofazercerveja.com.br , 05/05/2014	34
Figura 5- Caracterização de um cromatógrafo gasoso.....	39
Figura 6- Fibra de SPME, adaptado, Almeida <i>et al.</i> , 2004.....	42
Figura 7- Adsorção (extração) e dessorção da fibra, adaptado, Valente & Augusto, 2000.....	43
Figura 8 - Principais etapas da produção de malte.....	47
Figura 9 - Técnica de HS-SPME e GC-MS.....	52
Figura 10.- “Rampa” utilizada na corrida cromatográfica utilizada na análise do perfil de voláteis.....	53
Figura 11 - “Rampa” utilizada na corrida cromatográfica utilizada na quantificação do DMS	54
Figura 12 - Espectro de massa do DMS, adaptado, Marconi & Fantozzi., 2011	55
Figura 13 - Espectro de massa do EMS, adaptado, Marconi & Fantozzi., 2011	55
Figura 14 - Efeito do tipo de fibra na área total dos picos cromatográficos	62
Figura 15 - Efeito da temperatura na área total dos diferentes grupos químicos	63
Figura 16 - Vial de 15 ml com septo de borracha e contendo uma barra magnética e a placa de aquecimento com suporte para colocar a fibra	64
Figura 17 - Efeito da temperatura de adsorção na área total dos picos cromatográficos	66
Figura 18 - Efeito do tempo de adsorção na área total dos picos cromatográficos.....	66
Figura 19 - Efeito do tempo de dessorção na área total dos picos cromatográficos	67
Figura 20 - Fotografia das amostras de malte <i>pilsen</i> , de trigo, caramelo e chocolate, respectivamente.....	69
Figura 21 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis nos maltes especiais 1º lote.....	70
Figura 22 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis nos maltes especiais 2º lote	72
Figura 23 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote A.....	77

Figura 24 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote B	78
Figura 25 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote C	80
Figura 26 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote D	81
Figura 27 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote E	82
Figura 28 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote F	83
Figura 29 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote G	84
Figura 30 - Aldeídos - 3-Metilbutanal, 3-(Metiltio)propanal e o 3,5-Dimetilbenzaldeído com diferenças estatisticamente significativas no efeito da temperatura e 3-Metilbutanal, 2-Metilbutanal, Benzaldeído, 3-(Metiltio)propanal e 3,5-Dimetilbenzaldeído com diferenças estatisticamente significativas no processo de estufagem. a linha 1 representa a temperatura de 75°C e a linha 2 representa a temperatura de 85°C. os pontos 1, 2 e 3 representam a estufagem início, fim e malte final, respetivamente	88
Figura 31 - Cetona - 2-Octanone com diferença estatisticamente significativa no processo de estufagem em que a linha 1 representa a temperatura de 75°C e a linha 2 representa a temperatura de 85°C. os pontos 1, 2 e 3 representam a estufagem início, fim e malte final, respetivamente	90
Figura 32 - Álcoois - 1-Heptanol, 1-Nonanol e 2-(2-Butoxi)etanol e 2-Etil-1-hexanol com diferença estatisticamente significativa no efeito da temperatura e 2-Etil-1-hexanol com diferença estatisticamente significativa no efeito do processo de estufagem em que a linha 1 representa a temperatura de 75°C e a linha 2 representa a temperatura de 85°C. os pontos 1, 2 e 3 representam a estufagem início, fim e malte final, respetivamente.	92
Figura 33 - Aldeídos - n-Octanal, n-Heptanal, Decanal, 3-Metilbutanal, 3-(Metiltio)propanal e o (e)-2-Nonenal com diferença estatisticamente significativa no efeito da temperatura e 2-Etil-1-hexanol com diferença estatisticamente significativa no efeito do processo de estufagem em que a linha 1 representa a temperatura de 85°C e a linha 2 representa a temperatura de 75°C. os pontos 1, 2 e 3 representam a estufagem início, fim e malte final, respetivamente	95
Figura 34 - Álcoois- 2,3-Butanediol, 1-Nonanol e 1-Octanol com diferença estatisticamente significativa no efeito da temperatura e 2-(2-Butoxi)etanol com diferenças no efeito do processo de estufagem em que a linha 1 representa a temperatura de 85°C e a linha 2 representa a temperatura de 75°C. os pontos 1, 2 e 3 representam a estufagem início, fim e malte final, respetivamente	99
Figura 35 - Iões moleculares alvo para o DMS (62) e para o EMS (61) e respetivo tempo de retenção	102
Figura 36 - Curva de calibração para o DMS	103

Índice de Tabelas

Tabela 1- Compostos voláteis do malte, adaptado, Dong <i>et al.</i> (2013).	24
Tabela 2- Componentes do sabor e respetivo grupo químico, adaptado, Vandecan <i>et al.</i> (2010).	27
Tabela 3- Compostos voláteis e caraterísticas do odor encontrados no malte cristal, chocolate e cevada torrada, adaptado, Yahya <i>et al.</i> (2014).....	29
Tabela 4- Resumo dos diversos tipos de cerveja, adaptado, http://www.sindicerv.com.br	38
Tabela 5 - Condições experimentais para a quantificação do DMS	51
Tabela 6- Condições cromatográficas utilizadas no perfil de compostos voláteis.	52
Tabela 7 - Condições cromatográficas utilizadas na quantificação do DMS	53
Tabela 8 - Repetibilidade do método, média, desvio padrão e coeficiente de variação da família de compostos analisados.....	64
Tabela 9 - Repetibilidade do método, média, desvio padrão e coeficiente de variação.	68
Tabela 10 - Resultados da anova two-way para avaliar o efeito da temperatura e do processo de estufagem nos aldeídos do malte da variedade <i>Quench</i>	87
Tabela 11 - Resultados da ANOVA TWO-WAY para avaliar o efeito da temperatura e do processo de estufagem nas cetonas do malte da variedade <i>Quench</i>	90
Tabela 12 - Resultados da ANOVA TWO-WAY para avaliar o efeito da temperatura e do processo de estufagem nos álcoois do malte da variedade <i>Quench</i>	91
Tabela 13 - Resultados da ANOVA TWO-WAY para avaliar o efeito da temperatura e do processo de estufagem nos aldeídos da variedade <i>Tipple</i>	94
Tabela 14 - Efeito da temperatura e processo de estufagem nas cetonas da variedade <i>Tipple</i>	97
Tabela 15 - Resultados da ANOVA TWO-WAY do efeito da temperatura e do processo de estufagem nos álcoois do malte da variedade <i>Tipple</i>	98
Tabela 16 - Resultados da curva de calibração.	103
Tabela 17 - Resultados dos ensaios de recuperação (n=6).....	104
Tabela 18 - Média, desvio padrão, coeficiente de variação e concentração final do DMS em 8 lotes de cevada submetida ao processo de minimaltaria.	105

Abreviaturas

- **DDMP:** (*2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one*) - 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4*H*-piran-4-ona
- **DMS:** Dimetilsulfureto
- **GC:** (*Gas chromatography*) - Cromatografia gasosa
- **MS:** (*Mass spectrometry*) - Espectrometria de massa
- **GC-MS:** (*Gas chromatography–mass spectrometry*) - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
- **EMS:** Etil-metil-sulfureto
- **HS-SPME:** “*Headspace*” (*Solid-phase microextraction*) – Microextração em fase sólida
- **DVB-CAR-PDMS:** Divinilbenzeno-carboxeno-polidimetilsiloxano
- **CAR-PDMS:** Carboxeno-polidimetilsiloxano

1. Introdução e objetivos

- 1.1 Grãos de cevada**
- 1.2 Obtenção do malte**
- 1.3 Compostos voláteis do malte**
- 1.4 Obtenção da cerveja**
- 1.5 Análise por SPME GC MS de compostos voláteis**
- 1.6 Objetivos do trabalho**

1.1 Grãos de cevada

A cevada (*Hordeum vulgare* ou *Hordeum distichon*) (Bamforth, 2003) é um cereal muito utilizado na dieta humana e na alimentação animal. Este cereal faz parte da família das gramíneas, é produzido em grandes quantidades em mais de 100 países e é um cereal popular, superado apenas, pelo trigo, milho e arroz (Dabina-Bicka *et al.*, 2010). A cevada adapta-se facilmente a vários climas (Tarjoc & Tābarā, 2011), resiste em ambientes secos e quentes, em solos pobres e com alguma salinidade. Estas condições contribuem para que este cereal seja produzido abundantemente em diversas zonas geográficas. (Weiss & Zohary, 2011).

Os grãos de cevada (Figura 1) apresentam uma forma ovóide, são rodeados por camadas protetoras de casca, contêm um pequeno embrião na extremidade separado pelo escutélulo do endosperma.

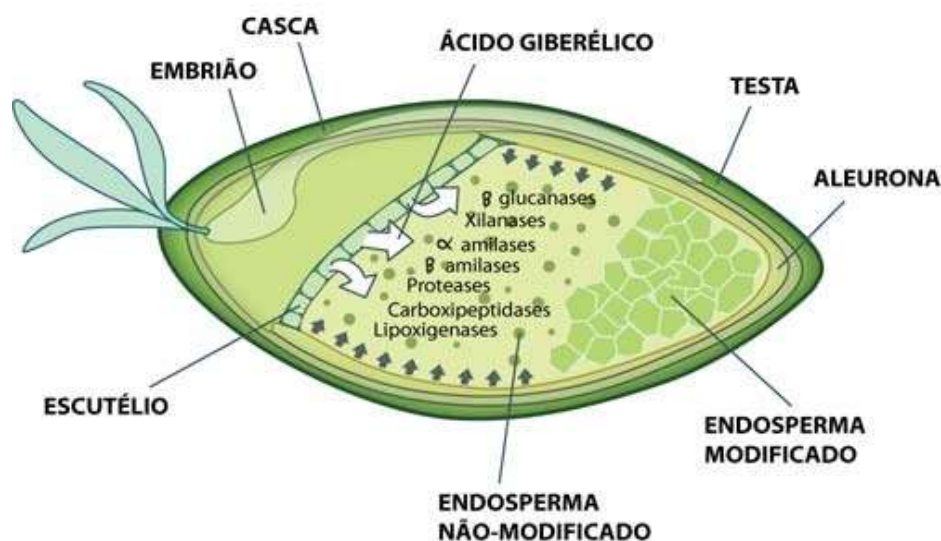


Figura 1- Morfologia de um grão de cevada, adaptado de <http://veja.abril.com.br/>, 29/04/2014.

O embrião representa a parte viva da planta. É o embrião que durante o processo de maltagem, irá germinar e dar origem a uma nova planta. O embrião é fundamental para a malteação, pois se o grão está morto, jamais poderá germinar e, portanto, originar malte de cevada.

O endosperma é maioritariamente constituído por células mortas de grandes dimensões que apresentam uma parede celular espessa, sendo maioritariamente

constituídas por β -glucanos, que são polímeros de moléculas de glucose que se ligam através de ligações β -glicosídicas. Estas células mortas contêm grânulos de amido no interior, estes podem apresentar dois tamanhos: os de grandes dimensões com cerca de 15-20 μm de diâmetro e os de pequenas dimensões com cerca de 2 μm de diâmetro. Os grânulos de amido são envolvidos por uma matriz de hordeína (proteína insolúvel) que providencia um armazenamento de péptidos e aminoácidos para a nova planta que irá germinar. O endosperma do amido é envolvido pelo aleurona (tripla camada de células vivas) (Hughes & Baxter, 2001).

1.1.1 Variedades de cevada

Prestige é uma variedade de referência em termos de qualidade tecnológica, porém a elevada suscetibilidade às principais doenças tornam a sua produção pouco competitiva quando comparada com outras variedades, pois é necessário realizar tratamentos com fungicidas. Outras variedades de cevada muito usadas para o fabrico do malte incluem a variedade *Scarlett* que é de origem alemã, apresenta características de rusticidade, sendo adequada para a produção de sequeiro; a *Pewter* é uma variedade de cevada alternativa porque tem uma grande resistência à doença de “*Rhynchosporium*” (organismo patogénico mais destrutivo da cevada em todo o mundo que diminui a produtividade até 40% e a qualidade dos grãos) o que a torna uma variedade particularmente adequada para a produção de regadio (disponível em http://www.hutton.ac.uk/research/groups/cell-and-molecular_sciences/rhynchosporium-barley, 13/06/2014; [http://agrogestao.com/ficheiros/Maltiberica Manual Boas Praticas Agricolas web.pdf](http://agrogestao.com/ficheiros/Maltiberica_Manual_Boas_Praticas_Agricolas_web.pdf), 02/09/2014).

A *Tipple* é um tipo de cevada que possui um elevado rendimento sendo útil no fabrico da cerveja. Este tipo de cevada caracteriza-se por ser relativamente curta, muito dura, resistente ao meio e ao dobramento da palha (disponível em <http://www.pickards.co.uk/farming/249/Spring-Varieties.aspx>, 13/06/2014).

A cevada *Quench* é uma variedade britânica com alto rendimento. Caracteriza-se por ter uma palha moderadamente curta, resistente ao meio, ao mofo e à doença de “*Rhynchosporium*”. É também suscetível a alguns tipos de ferrugem. Possui um tamanho de grão pequeno relativamente a outras variedades (disponível em [http://www.goldcrop.ie/images/Spring%20Barley%20Recommended%20List%202014\(1\).pdf](http://www.goldcrop.ie/images/Spring%20Barley%20Recommended%20List%202014(1).pdf), 13/06/2014). Variedades com maior resistência às doenças e pragas no campo,

absorvem maior quantidade de nutrientes, conseqüentemente apresentam maior capacidade germinativa formando mais enzimas entre outros constituintes.

1.2. Obtenção do malte

Uma grande parte da cevada é usada para a obtenção do malte, sendo este o cereal mais adequado e um importante ingrediente na produção de cerveja e de uísque. Os grãos de cevada são os mais escolhidos porque retêm a casca durante a debulha, e esta forma uma camada ou leito através do qual o mosto é filtrado durante o processo de fabrico da cerveja (Dabina-Bicka *et al.*, 2010).

O processo de maltagem tem como objetivo diminuir os β -glucanos presentes nas paredes celulares, bem como algumas proteínas insolúveis que dificultam o acesso das enzimas aos grânulos de amido. As enzimas que são ativadas durante este processo vão converter o amido em açúcares solúveis (Hughes & Baxter, 2001). A maltagem é subdividida em três etapas, nomeadamente, a molha, a germinação e a estufagem (Figura 2).

A molha inclui três etapas fundamentais: i) início da germinação e desenvolvimento do ácido giberélico na germinação do embrião; ii) transporte e ação do ácido giberélico na camada aleurona e, iii) a hidratação do endosperma amiláceo com o objetivo de facilitar a modificação enzimática do endosperma (Priest & Stewart, 2006).

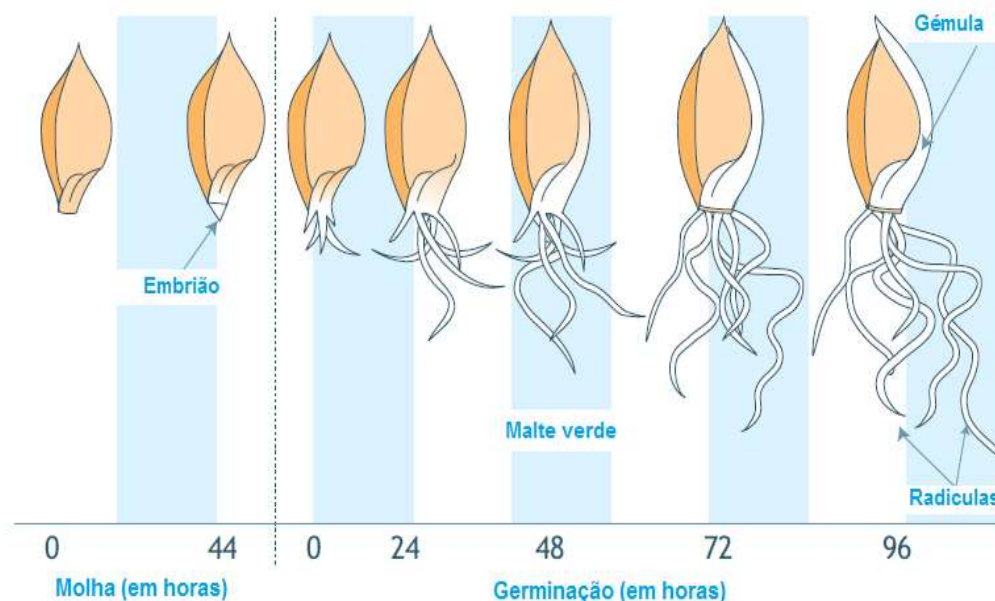


Figura 2 - Desenvolvimento germinativo de um grão de cevada, adaptado, de <http://pt.malteurop.com> 30/04/2014.

A cevada é embebida em água para elevar o seu teor de humidade de cerca de 12% para 45%. Este processo tem uma duração de aproximadamente 2 dias, sendo realizado em duas ou três etapas. O grão é totalmente imerso em água sendo esta periodicamente renovada, com o objetivo de proporcionar uma correta oxigenação dos grãos. O aumento do teor da água permite a estimulação do metabolismo do embrião, e hidratação do amido do endosperma. O aumento da atividade do embrião permite a produção das giberelinas (hormonas naturais de plantas que se difundem no aleuroma), estimulando a produção de enzimas hidrolíticas durante a germinação. A presente etapa termina quando surgem nas cascas dos grãos pequenas radículas brancas. Nesta fase os grãos encontram-se inchados (Hughes & Baxter, 2001).

Os grãos húmidos são deixados a germinar durante cerca de 4 a 5 dias. Nesta etapa o ar humidificado é mantido em contacto com os grãos de modo a manter uma temperatura média de 16 a 20° C para não secar o grão. As giberelinas difundem-se para o endosperma do embrião onde estimulam as células do aleurona a produzir enzimas hidrolíticas incluindo as amílases que provocam a quebra do amido, as peptidases que hidrolisam as proteínas e as celulasas que degradam a parede celular.

As peptidases incluem as carboxipeptidases, que degradam as cadeias de aminoácidos a partir da extremidade carboxílica e endopeptidases que quebram as ligações peptídicas no interior das cadeias de aminoácidos. Posteriormente, as β -glucanases vão quebrar a parede celular do endosperma tornando mais fácil a difusão de outras enzimas no interior do endosperma do amido. Todas estas enzimas vão difundir-

se no endosperma amiláceo de modo a destruir as paredes celulares, permitindo que proteínas, lípidos e amido fiquem acessíveis para servir de nutrientes para a nova planta. No fim desta etapa os grãos de cevada passam a denominar-se por malte “verde”, sendo o processo controlado pela indústria cervejeira até os constituintes do malte atingirem o grau de hidrólise desejado (Hughes & Baxter, 2001).

Finalmente é efetuada a estufagem, sendo esta a última etapa. A estufagem inativa microrganismos, previne a atividade enzimática e reduz a humidade do malte “verde” cerca de 43 para 5%. O objetivo desta etapa é estabilizar o grão permitindo um armazenamento a longo prazo (Priest & Stewart, 2006). Este processo permite remover os compostos voláteis responsáveis por sabores indesejáveis e através de um controlo eficaz da temperatura produzir uma vasta gama de maltes com diferentes características de aroma. As temperaturas mais altas podem rondar os 200°C ou mais e são utilizadas para a produção de maltes especiais com sabores, como o caramelo do malte cristal e sabores mais fortes como o malte torrado. Estas diferenças entre sabores podem ser utilizadas pela indústria cervejeira de modo a produzir uma vasta gama de sabores e cores na cerveja. O malte seco é desembaraçado das radículas, pois estas contêm grandes quantidade de proteínas que podem influenciar negativamente o sabor da cerveja final. O malte pode ser armazenado em silos de malte durante vários anos desde que mantenha o grau de humidade entre 5 e 6% (Hughes & Baxter, 2001).

De acordo com o processo de fabrico do malte, este pode ser classificado como Deslavado, *Pilsen*, Viena, *Munique*, Caramelo, Turfa, Diastásico, Torrado, Preto, entre outros. A cor do malte é um dos fatores de diferenciação. O malte de cor é habitualmente mais utilizado em cervejas de cor âmbar ou castanhas, enquanto um malte mais claro é escolhido para cervejas do tipo *pilsen* (disponível em <http://pt.malteurop.com>, 30/04/2014).

A cor do malte é produzida pelas elevadas temperaturas de estufagem utilizadas pelo forno. Estas temperaturas podem atingir um máximo de 105°C nos maltes menos escuros. Os maltes mais escuros (caramelo e torrado) são obtidos pela torrefação do malte verde e malte *pilsen* a uma temperatura de 220-250°C. Para a obtenção de malte caramelo é incluída uma etapa antes da torrefação para permitir a extensa hidrólise de hidratos de carbono e proteínas no interior do malte (Coghe *et al.*, 2005; Čechovská *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da cor do malte resulta das reações entre açúcares e aminoácidos do malte formando melanoidinas, estas reações são denominadas por reações de *Maillard*. Os produtos de tratamento da torrefação têm propriedades

antioxidantes sendo importantes no que diz respeito à estabilidade da cerveja, constituindo uma fonte antioxidante na dieta (Priest & Stewart, 2006).

1.2.1 Reações de *Maillard*

Os compostos aromáticos voláteis provenientes do malte desempenham um papel importante na composição do aroma da cerveja (Vanderhaegen *et al.*, 2003; Fritsch & Schieberle, 2005; Pinho *et al.*, 2006; De Schutter *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2013). Estes compostos aromáticos são provenientes, não só da composição química da cevada (matéria-prima), mas também da forma como esta é processada durante a maltagem (Yahya *et al.*, 2013). As reações de *Maillard* têm um papel relevante na formação de compostos voláteis no malte (Dong *et al.* 2003). Durante a germinação da cevada ocorre a libertação de açúcares simples e de aminoácidos que quando submetidos ao calor, combinam-se e originam uma grande variedade de compostos resultantes das reações de *Maillard*. Estes produtos são diferentes dependendo da severidade da secagem e da atividade da água no grão. O malte de cor menos intensa tende a produzir cerveja com menos cor e sabor, enquanto, os maltes especiais como o caramelo ou o chocolate contribuem, de uma forma mais intensa, para a cor e sabor da cerveja. As substituições da cevada maltada por cereais não maltados provocam uma diminuição do sabor da cerveja, por outro lado, os cereais como o sorgo são também usados na produção de cerveja, provocando um sabor distinto devido à composição dos diferentes compostos ativos que se desenvolvem neste grão (Hughes, 2009).

O bioquímico francês Louis-Camille Maillard em 1912 demonstrou que durante o aquecimento de um alimento, os aminoácidos e os açúcares redutores reagem levando à formação de substâncias castanhas denominadas de melanoidinas. Estas reações passaram a denominar-se por reações de *Maillard*. Durante a confeção de certos alimentos, as reações de *Maillard* iniciam-se com o ataque nucleofílico do grupo α -carbonílico de um açúcar redutor. Existem diversos fatores cruciais para que estas reações ocorram, nomeadamente, temperaturas elevadas, atividade da água, pH, humidade relativa e a presença de iões metálicos que ajudam a catalisar a reação. O tipo de alimento, bem como, a sua composição também são importantes para a formação destas reações. As reações de *Maillard* dividem-se em três fases: inicial, intermédia e final. Na fase inicial ocorre a condensação de um grupo carbonilo de um açúcar redutor, levando à formação de glicosil/frutosilaminas *N* substituídas, originando o primeiro produto estável da reação denominado de produto de *Amadori*. Nos alimentos ricos em

proteínas o grupo amina do resíduo da lisina é um alvo importante para o ataque de açúcares redutores. O aquecimento do alimento prolonga-se na fase intermédia e os produtos de *Amadori* dão origem a reações de desidratação, enolização e retroaldonização originando compostos dicarbonílicos, derivados do furfural ou resultando em produtos provenientes da degradação de aminoácidos, denominado de degradação de *Strecker*. Na fase final, os produtos dicarbonílicos (intermediários), extremamente reativos, podem reagir com os resíduos dos aminoácidos lisina ou arginina de uma proteína originando compostos estáveis. Nesta última fase há a formação de reações de fragmentação e polimerização com a formação de compostos acastanhados de elevado peso molecular, denominado de melanoidinas (Martins *et al.*, 2000; Nursten, 2005; Shibao & Bastos, 2011; Nunes & Baptista, 2011).

Nas últimas décadas, as reações de *Maillard* têm sido alvo de especial atenção por parte dos profissionais de saúde, bem como, dos investigadores por ocorrerem aquando da preparação de determinado alimento havendo formação de compostos do aroma e da cor. Estas reações verificam-se, maioritariamente, na carne assada, peixe cozido, ovos cozidos e batatas. Os aromas doces e aromas provenientes das padarias produzidos a partir das reações de *Maillard* compreendem o torrado do cacau e nozes, chocolate, malte, pipocas e pão. Nas bebidas, o sabor do café, cerveja, uísque e chá deve-se em grande parte às reações de *Maillard* (Cerny, 2008).

1.2.2 Tipos de malte

De acordo com as matérias-primas e as condições usadas na maltagem, diferentes tipos de malte podem ser produzidos. Os seguintes maltes apresentam características que correspondem, maioritariamente, aos requisitos apresentados pela empresa Unicer, deste modo é de destacar os maltes *pilsen* e de trigo, e os maltes especiais como o caramelo, chocolate e cristal:

1.2.2.1 Malte *Pilsen*

O malte *pilsen* é o resultado da cevada germinada com posterior secagem em condições tecnologicamente adequadas, normalmente utilizando uma temperatura de 85°C de ar que deve ser mantida à entrada do secador num período mínimo de 3 horas,

isto para garantir uma temperatura mínima (80°C) de ar à saída por um período mínimo de 1 hora. O malte *pilsen* pode ser declarado como: “Malte de cevada” (Unicer^c, 2012).

1.2.2.2 Malte de Trigo

O malte de Trigo é produzido através do trigo e é um malte de base para a produção de cerveja. Este contribui com um aroma herbáceo e com uma melhor formação de espuma. Na sua aplicação final, este malte é declarado como “Malte de Trigo” e é usado como matéria-prima na fabricação do mosto (Unicer^d, 2012).

1.2.2.3 Malte Caramelo

O malte Caramelo é produzido a partir do malte verde. Este malte é muito modificado e possui elevado teor de doçura, bem como um aroma forte a caramelo. O seu endosperma é praticamente vítreo. Este tipo de malte é capaz de melhorar consideravelmente o corpo e estabilidade da espuma da cerveja, havendo um ligeiro aumento da sua coloração e do seu carácter a malte. Este tipo de malte deve ser um produto puro, doce, com sabor a caramelo, isento de aromas e gostos estranhos. A sua forma e cor devem ser uniformes e sem sinais de contaminação por microrganismos, roedores ou pestes. Na sua aplicação final, pode ser declarado como: “Malte de cevada” e pode ser usado como matéria-prima no processo de fabricação do mosto (Unicer^b, 2012).

1.2.2.4 Malte Chocolate

O malte chocolate dá um sabor torrado à cevada, não transmitindo o carácter amargo e queimado do malte preto. Este tipo de malte deve apresentar um sabor torrado e isento de aromas e gostos estranhos. O malte chocolate deve, apenas, apresentar grãos torrados e não queimados, deve ter uma forma e cor uniforme, e sem sinais de contaminação por microrganismos pestes ou roedores. Na sua aplicação final, pode ser declarado como: “Malte de cevada” e pode ser usado como matéria-prima no processo de fabricação do mosto (Unicer^a, 2012).

1.2.2.5 Malte Cristal

O malte cristal é usado frequentemente no fabrico de cerveja, conferindo uma cor e aroma muito acentuado. A taxa de adição deste malte à cerveja varia conforme a indústria, normalmente as taxas compreendem um valor entre 3% a 5% mas existem indústrias que usam um total de 10% de malte cristal na cerveja. Este malte possui um aroma belga com caramelização especial. Tem um processo de germinação particular, caramelizando em várias etapas de modo a desenvolver um sabor único. O sabor deste malte é geralmente descrito como caramelo ou torrado proporcionando um sabor e aroma de malte rico a cervejas *Lager* âmbar e escuras (Jackson & Hudson, 1977).

1.3. Compostos voláteis do malte

Durante a maltagem ocorrem modificações qualitativas e quantitativas no perfil de compostos voláteis. Cramer *et al.* (2005) designaram os seguintes compostos: 1-octen-3-ol, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, hexanal, 2-hexenal, 2-heptenal, 2-nonenal e decanal como *key odorants* na cevada.

Dong *et al.* (2013) analisaram cevada, malte verde e malte final durante o processo completo de maltagem tendo identificado um total de 47 compostos voláteis (incluindo aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos, e compostos furânicos). Os autores organizaram os resultados da análise de voláteis em 6 grupos (Tabela 1).

Tabela 1- Compostos voláteis do malte, adaptado, Dong *et al.* (2013).

Malte	
Grupo	Compostos voláteis
Grupo I	Álcoois: <ul style="list-style-type: none"> ➤ 2-Metil-1-propanol
Grupo II	Aldeídos: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Octanal Cetonas: <ul style="list-style-type: none"> ➤ 2,3-Pentanediona ➤ 3-Hidroxi-2-butanona ➤ 3,5-Octadien-2-ona Ácidos orgânicos: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Ácido heptanoico Outros: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Etilbenzeno ➤ 2-metil-furan
Grupo III	Aldeídos: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Decanal Álcoois: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Ciclopentanol ➤ (Z)-2-penten-1-ol Ácidos orgânicos: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Ácido hexanoico Outros: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Metacroleína ➤ Ácido hexanoico etil ester
Grupo IV	Aldeídos: <ul style="list-style-type: none"> ➤ 2-Hexanal ➤ (Z)-2-Heptanal ➤ (E,Z)-6-Nonadial Álcoois: <ul style="list-style-type: none"> ➤ 3-Metil-1-butanol ➤ (Z)-2-Nonen-1-ol Cetonas: <ul style="list-style-type: none"> ➤ 2,3-Butanediona ➤ 6-Metil-5-hepten-2-ona Outros: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Benzenoacetaldeído ➤ Álcool fenil-etil ➤ 2-Pentil-furano
Grupo V	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dimetilsufóxido

Grupo VI**Aldeídos:**

- 2-Metil-propanal
- Acetaldeído
- 3-Metil-butanal
- 2-Metil-butanal
- Pentanal
- Hexanal
- Heptanal
- (E)-2-Octenal
- Nonanal
- (E)-2-Nonenal

Álcoois:

- Etanol
- 1-Penten-3-ol
- 1-Pentanol
- 1-Hexanol
- 1-Octen-3-ol

Cetonas:

- 2-Heptanona

Ácidos orgânicos:

- Ácido acético

Outros:

- Benzaldeído
- Acetato de etilo
- 3-Etil-2-metil-1,3-hexadieno
- Naftaleno

O grupo I corresponde aos voláteis da própria cevada que tendem a desaparecer posteriormente, no processo de maltagem e de torrefação. O grupo II inclui os voláteis da cevada e do processo de maltagem que desaparecem durante a torrefação. Do grupo III fazem parte os compostos formados durante o processo de maltagem e que tendem a desaparecer após o processo de torrefação. O grupo IV representa os voláteis que foram formados aquando do processo de maltagem, que resistem à torrefação e que permanecem no malte. O grupo V corresponde aos compostos formados apenas no processo de torrefação e que permanecem posteriormente no malte e por fim o grupo VI corresponde a todos os compostos voláteis existentes em todo o processo de maltagem e torra e que permaneceram no malte

Os grupos IV, V e VI foram aqueles que relevaram importância a nível industrial, isto porque, o aroma do malte desempenha um papel importante no processo de produção da cerveja. Segundo os autores, a maioria destes compostos foram aumentando ao longo do processo de germinação, estufagem e torrefação, sendo o número de voláteis superiores nesta última etapa. Os compostos 2-hexanal, (E,Z)-6-nonadienal, 3-metil-1-butanol, (Z)-2-nonen-1-ol, 2,3-butanodiona, 6-metil-5-hepten-2-ona, benzenoacetaldeído, sulfureto de dimetilo, (Z)-2-heptanal e 2-pentil-furano foram somente

encontrados no malte, enquanto que, o octanal, 2-metil-1-propanol, 3,5-octadien-2-ona, ácido heptanoico e 2-metil-furano foram somente identificados na cevada. Nos grupos IV, V e VI, resumem-se os voláteis mais importantes do malte.

Dong *et al.* (2013) seguiram a evolução de determinados grupos químicos (aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos orgânicos e compostos furânicos) e concluíram, neste estudo, que os aldeídos foram os compostos predominantes na cevada em que o 2-metilpropanal, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, hexanal, 2-hexenal e 2-nonenal, vulgarmente designados como *key odorants* do malte, aumentaram continuamente no processo de germinação. Os compostos 2-metilpropanal, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, e 2-nonenal aumentaram durante a secagem, enquanto o hexanal e 2-hexenal diminuíram.

Antes do estudo descrito anteriormente, outro trabalho foi desenvolvido por Vandecan *et al.* (2010), com o objetivo de identificar os compostos voláteis em amostras de malte torrado (EBC1500), de malte caramelo (EBC150) e de malte de cor (EBC65) os quais poderão influenciar o sabor final da cerveja. Neste estudo foram selecionados 14 compostos responsáveis pelo *flavour* (Tabela 2). Esta seleção baseou-se na composição em voláteis de alimentos sujeitos a torrefação, nomeadamente o cacau e o café, assim como, o aroma responsável por diversos componentes destes cereais.

De acordo com Vandecan *et al.*, (2010) as concentrações de pirazinas (2,3,5-trimetilpirazina, 2,3-dietil-5-metilpirazina e 2-etil-3,5-dimetilpirazina) são mais elevadas em malte sujeito a torrefação. As alquilpirazinas surgem devido às elevadas temperaturas que ocorrem durante o processo de secagem do malte (250°C) sendo característico em maltes torrados. As alquilpirazinas resultam da condensação de duas aminocetonas com posterior oxidação da diidropirazina e podem também, ser formadas por um ataque nucleofílico da diidropirazina sobre um grupo carbonilo de um aldeído, com eliminação de água.

Tabela 2- Componentes do sabor e respetivo grupo químico, adaptado, Vandecan *et al.* (2010).

Grupo químico	Elementos químicos	Sabor
➤ Piranona	➤ 3-Hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona (maltol)	➤ Caramelo
➤ Furanona	➤ 4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (furaneol)	➤ Caramelo
	➤ 4-Hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona (norfuraneol)	➤ Caramelo
➤ Ciclopentanona	➤ 2-Hidroxi-3-metilciclopent-2-en-1-one (cicloteno)	➤ Caramelo
➤ 2-Alcanal ramificado	➤ 2-Isopropil-5-metil-2-hexanal	➤ Doce, noz
	➤ 4-Metil-2-fenil-2-pentanal	➤ Cacau
	➤ 5-Metil-2-fenil-2-hexanal	➤ Cacau
	➤ 2-Fenil-2-butanal	➤ Cacau
➤ Pirazina	➤ 2,3,5-Trimetilpirazina	➤ Cacau, noz torrada,
	➤ 2,3-Dietil-5-metilpirazina	➤ amendoim
	➤ 2-Etil-3,5-dimetilpirazina	➤ Sabor terroso
➤ Pirrol	➤ 2-Acetilpirrol	➤ Sabor terroso
➤ Lactona	➤ γ -Nonalactona	➤ Noz
➤ Cetona	➤ β -Damascenona	➤ Coco
		➤ Doce, maçã cozida

Os compostos norfuraneol e furaneol (formados durante os estágios intermédios das reações de *Maillard*) estão em concentrações elevadas no malte caramelo. Durante o processo de torrefação estes mesmos compostos podem reagir com estruturas mais complexas, como por exemplo as melanoidinas, que se encontram abundantemente no malte torrado. O maltol é um composto que apresenta uma concentração duas vezes maior no malte torrado comparativamente ao malte de cor. O cicloteno (composto formado através das reações de *Maillard* e através da pirólise, ocorrendo a temperaturas ideais para a produção do malte torrado) encontra-se em quantidades comparáveis em malte caramelo e malte torrado (Vandecan *et al.*, 2010).

Foram encontradas elevadas concentrações de β -damascenona e γ -nonalactona no malte de cor com concentrações de 10,83 $\mu\text{g/g}$ e 0,76 $\mu\text{g/g}$, respetivamente. A β -damascenona pode ser formada através de elevadas temperaturas resultando na degradação da 9'-cis-neoxantina. A γ -nonalactona é produzida a partir do ácido linoleico. Durante a torrefação, β -damascenona e γ -nonalactona, volatilizam uma grande quantidade da matriz, deste modo, estes compostos encontram-se abundantemente no malte de cor e no malte caramelo (Vandecan *et al.*, 2010).

Os compostos 5-metil-2-fenil-2-hexenal, 4-metil-2-fenil-2-pentanal e 2-isopropil-5-metil-2-hexenal foram encontrados em elevadas quantidades no malte de caramelo com concentrações de 3,82 µg/g, 0,62 µg/g e 3,12 µg/g respectivamente. Os compostos 5-metil-2-fenil-2-hexenal e 4-metil-2-fenil-2-pentanal são formados após a condensação aldólica do fenilacetaldeído com o 3-metilbutanal e 2-metilpropanal, enquanto, o 2-isopropil-5-metil-2-hexenal resulta da condensação entre duas moléculas de 3-metilbutanal.

A baixa concentração dos compostos 5-metil-2-fenil-2-hexenal com uma concentração não quantificável, 4-metil-2-fenil-2-pentanal com concentração de 0,20 µg/g e 2-isopropil-5-metil-2-hexenal com concentração de 0,69 µg/g, no malte torrado pode ser justificada pela sua volatilização originada a temperaturas elevadas de torrefação (Vandecan *et al.*, 2010).

Recentemente Yahya *et al.* (2014) realizaram estudos em cevada torrada, malte cristal e malte preto recolhidas ao longo do processo de produção, com o objetivo de determinar a evolução do *flavour*, o teor de humidade, a cor e compostos voláteis responsáveis pelo *flavour*. Os autores verificaram diferenças nos cromatogramas dos três tipos de amostras, mas também observaram algumas semelhanças. O malte cristal continha uma maior quantidade de compostos voláteis do que a cevada torrada. Nas amostras analisadas foram identificados 15 compostos voláteis comuns (Tabela 3).

Yahya *et al.* (2014) verificaram que as principais diferenças de composição foram entre os produtos torrados (cevada torrada e malte preto) e o malte cristal. O malte cristal foi produzido com um maior teor de humidade a uma baixa temperatura a partir da cevada. Os baixos níveis de humidade e a elevada temperatura de torrefação provocaram um aumento significativo dos níveis de metilpirazina, furfural, pirrol, 5-metil-2-furfural, benzenoacetaldeído e maltol. Por outro lado o malte cristal possuía maiores quantidades de 2-ciclopenteno-1,4-diona, ismaltol, 2-furanometanol, 5-metil-2-furanometanol, 2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona e 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (DDMP). Este último composto, com elevado teor de humidade, mostrou uma importância significativa na formação do *flavour*. O DDMP é um produto da via 1-deoxiosona das hexoses que são encontrados em alimentos aquecidos e armazenados. De acordo com a literatura, as quantidades de DDMP são formadas durante o aquecimento a seco de ingredientes contendo o aminoácido prolina que é quantitativamente o aminoácido prevalente na cevada. A grande importância do DDMP no sabor da cevada torrada e do malte é devido aos seus produtos de degradação como o maltol, furaneol e isomaltol, que são formados em diferentes proporções e que dependem da temperatura e humidade do sistema acima dos 150°C (Yahya *et al.*, 2014).

Tabela 3- Compostos voláteis e características do odor encontrados no malte cristal, chocolate e cevada torrada, adaptado, Yahya *et al.* (2014).

Compostos químicos	Caraterísticas do odor
➤ 2,3-Pentanediona	➤ Amanteigado, noz, caramelo
➤ Metilpirazina	➤ Pipoca, noz, cacau
➤ Ácido acético	➤ Vinagre
➤ 2-Furaldeído (furfural)	➤ Pão, amêndoa, doce
➤ Pirrole	➤ Doce, quente, noz, etéreo
➤ 5-Metil-2-furfural	➤ Amêndoa, caramelo, açúcar queimado
➤ 2-Ciclopentene-1,4-diona	
➤ Ismaltol	➤ Açúcar queimado, frutado
➤ Benzenoacetaldeído	➤ Floral, mel, doce
➤ 2-furanometanol	➤ Pão, doce, caramelo
➤ 5-metil-2-furanometanol	➤ Caldo, maltado
➤ 2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona	➤ Caramelo, doce
➤ Maltol	➤ Caramelo
➤ 2,5-Dimetil-4-hidroxi-3(2 <i>H</i>)-furanona (DMHF ou Furanol)	➤ Doce, frutado, caramelo
➤ 2,3-diidro-3,5-diidroxi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-ona (DDMP)	➤ Doce biscoito

A formação da cor durante os processos de torrefação do malte torna-se difícil de correlacionar com a análise dos compostos que são responsáveis pelo aroma (Yahya *et al.*, 2014). As coordenadas $L^*a^*b^*$ da cor em que o L^* corresponde à luminância, expressa em percentagem de 0 para o preto a 100 para o branco; O a^* e b^* são coordenados cromáticas em que o a^* vai do verde ao vermelho entre $-a^*$ e $+a^*$ respetivamente e o b^* vai do azul ao amarelo entre $-b^*$ e $+b^*$ respetivamente (Kantola *et al.*, 2013). Estas coordenadas nem sempre estão de acordo com os aumentos dos compostos voláteis monitorados. Isto acontece porque as concentrações dos compostos voláteis são influenciadas por fatores como a volatilização, a concentração dos seus precursores e reações químicas ou processos de degradação e de fatores térmicos (Yahya *et al.*, 2014).

Nas amostras de cevada torrada, malte preto e malte cristal analisadas por Yahya *et al.*, 2014, houve períodos de aumento da cor vermelha do grão (a^*) que coincidiram com a produção de certos produtos provenientes das reações de *Maillard*, como o DDMP. No entanto, no malte cristal houve uma intensa formação de compostos do *flavour*, e uma fraca formação de cor (Yahya *et al.*, 2014).

1.4 Obtenção da cerveja

A cerveja é uma das bebidas mais antigas e mais consumidas do mundo datando 8000 a.C. O método mais antigo foi descrito pelos sumérios em 3000 a.C., numa tabuleta de argila que descrevia que a produção de “*pão da cerveja*” era feita misturando o fermento e a farinha de cevada com a água adicionando, seguidamente, água ao “*pão de cerveja*”. O primeiro tipo de cerveja foi produzido por fermentação alcoólica (Limure & Sato, 2013).

A cerveja foi, provavelmente, criada antes do pão, o que impulsionou ao cultivo de cereais tipo a cevada e o trigo. A sua produção era muito mais simples que o pão e de obtenção relativamente fácil e por vezes, podia ser obtida ao acaso, bastava apenas que algum recipiente de barro com cevada fosse molhado devido à intensa precipitação e mau acondicionamento, resultando na germinação do grão. Passados alguns dias aquela água era filtrada e bebida. Segundo a literatura, há mais de 6000 anos os sumérios na Mesopotâmia (Iraque) produziam cerveja denominada de “*pão líquido*” este alimento era considerado uma fonte de energia e de hidratação, sendo distribuído aos trabalhadores daquela altura (Oliveira, 2009).

No antigo Egito, a cerveja juntamente com o pão formava o produto mais importante na dieta dos egípcios. A cerveja era um produto indispensável nas refeições de todo este povo desde o Faraó até ao simples agricultor e sem esta bebida a refeição ficava incompleta. A cerveja era considerada muito mais do que um simples género alimentício, ou seja, servia também de unidade de troca nas sociedades mais pobres, tal como as moedas atualmente. Para além destas características, esta bebida, teve um papel fundamental em crenças religiosas e práticas rituais (Bamforth, 2003).

Aquando da intensa precipitação e quando os grãos eram deixados a secar o processo de germinação completava e as pessoas ao cozinha-los verificavam uma melhoria significativa no seu aroma. Rapidamente se aperceberam que o malte era nutricionalmente melhor que a cevada crua e que aqueles que consumiam malte eram mais saudáveis que aqueles que incluíam a cevada na sua dieta. Os egípcios passaram as suas técnicas do fabrico da cerveja para outros povos, como os gregos e os romanos. Na Grécia e Roma a bebida consumida pelas classes altas era o vinho, a cerveja era consumida pelo restante povo. Os celtas através das suas rotas nórdicas trouxeram para o oeste a receita do fabrico da cerveja. Este facto pode estar relacionado com a capacidade dos povos da Europa do norte e central fabricarem e acondicionarem a cerveja em vasos e barris. A levedura usada no fabrico da cerveja teve origem em

Espanha. A *Cerevisia* foi encontrada por Plínio na Gália e cério (Ceres) formando, assim, a levedura denominada de *Saccharomyces cerevisiae* (Bamforth, 2003).

A produção de cerveja (Figura 3) inicia-se na maltagem, como referido anteriormente, e as etapas seguintes da sua preparação que serão descritas neste capítulo.

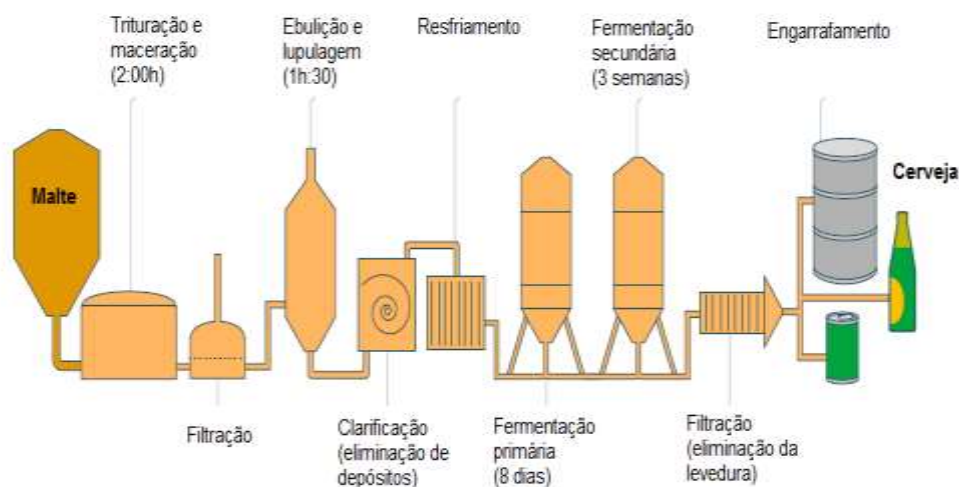


Figura 3- Do malte à cerveja, disponível em <http://pt.malteurop.com>, 30/04/2014.

Existem quatro passos necessários para a produção da cerveja: preparação do mosto incluindo a maceração e ebulição, fermentação, maturação e filtração e/ou estabilização.

O malte antes de ser macerado tem de ser moído. Nesta fase deve haver a remoção de pós, pedras e metais que possam estar entre os grãos de malte. A moagem possibilita a rápida extração e conversão dos componentes do malte, deste modo, os ingredientes do malte tornam-se mais fáceis de dissolver. As cascas do malte devem ser conservadas porque servem de camada de filtração durante a drenagem do mosto. O malte deve ser moído num dispositivo apropriado, a sua qualidade tem impacto sobre a maceração e a drenagem do mosto e consequentemente na qualidade da cerveja. O malte moído é misturado com água durante a maceração. As enzimas ajudam a dissolver os diversos constituintes do malte. Este processo é regulado pela temperatura, pH e pelo teor de humidade no grão. Esta fase dura cerca de 2 a 4 horas e termina com uma temperatura de 75°C, ocorrem diversas reacções, incluindo proteólise, citólise e digestão

do amido (Wunderlich & Back, 2009; Pavsler & Buiatti, 2009^{a,b}; Nanadoum & Pourquie, 2009).

O amido é constituído por amilose e amilopectina e a sua dissolução ocorre em três passos: gelatinização do amido, liquefação e sacarificação. Os grãos de amido absorvem água durante a gelatinização, incham e rebentam. A temperatura, neste passo, depende do tipo de cereal, no caso do amido de malte, gelatiniza a uma temperatura de 60°C na presença de amilases. O amido gelatinizado é normalmente, digerido durante a liquefação. A α -amílase hidrolisa as ligações α -1,4 da amilose e amilopectina resultando em quebras nas ligações glicosídicas do amido e na formação de grandes fragmentos. Nesta fase a viscosidade tende a diminuir e novas superfícies reativas ficam acessíveis para a β -amilase hidrolisar. As dextrinas são hidrolisadas em maltose durante a sacarificação (Wunderlich & Back, 2009; Pavsler & Buiatti, 2009^{a,b}; Nanadoum & Pourquie, 2009).

As enzimas que realizam a proteólise são divididas em endo e exo-peptidases sendo estas caracterizadas segundo a sua especificação. As endo-peptidases quebram as proteínas no seu interior e aumentam o teor de azoto solúvel. As exo-peptidases atacam a terminação da cadeia proteica, libertando assim, aminoácidos. De acordo com os valores de temperatura e pH, algumas proteínas tendem a precipitar durante a maceração. A temperatura de 50°C é ideal para ocorrer uma grande degradação das proteínas. Os produtos de degradação proteica surgem com uma temperatura entre 60°C a 70°C. Estes produtos são de extrema importância porque fornecem à cerveja a espuma e um sabor intenso (Wunderlich & Back, 2009; Pavsler & Buiatti, 2009^{a,b}; Nanadoum & Pourquie, 2009).

Adicionalmente, os produtos da degradação dos grãos resultantes da quebra das hemiceluloses aumentam a viscosidade durante a citólise. A maior desagregação ocorre com temperaturas que rondam os 50°C e quanto mais baixas forem as temperaturas maior a desagregação. As ligações de hidrogénio das moléculas de β -glucanos quebram durante o aquecimento e posterior ebulição. Estas ligações podem levar ao aumento da viscosidade resultando em problemas na clarificação e filtração da cerveja.

No que respeita aos lípidos a maioria são insolúveis, devendo ser, posteriormente, removidos da cerveja. Os ácidos gordos não saturados resultam de reações com o oxigénio ou degradação enzimática em grupos carbonilo através da lipoxigenase havendo a diminuição da estabilidade do sabor mesmo a baixas concentrações. Este processo pode ser minimizado através da moagem com gás inerte e baixa quantidade de oxigénio e pode também ser minimizado através da maceração com temperaturas acima

dos 60°C e valores de pH baixo (Wunderlich & Back, 2009; Nanadoun & Pourquie, 2009).

A filtração tem como objetivo a separação da parte insolúvel do filtrado (mosto), funcionando as cascas como filtros. O mosto é separado das cascas num recipiente denominado de tonel de drenagem do mosto (Wunderlich & Back, 2009). Na filtração o mosto é diluído pela entrada de água à mesma temperatura para obtenção de um rendimento adequado, tendo uma duração de cerca de 2-3 horas, conduzida a uma temperatura de 75-80 °C. Posteriormente realiza-se a ebulição do mosto durante cerca de 2 horas, no recipiente para onde foi drenado, seguindo uma série de passos:

- Evaporação de parte da água;
- Isomerização de substâncias amargas provenientes do lúpulo;
- Evaporação de sabores provenientes de substâncias não desejáveis como o dimetilsulfureto (DMS);
- Formação de cor e do aroma;
- Precipitação de proteínas coaguladas (floculação);
- Esterilização do líquido extraído após a maceração;
- Inativação enzimática.

A maioria das indústrias cervejeiras tendem a ferver o mosto entre 1 a 2 horas, evaporando cerca de 4% do mosto por hora. Esta fase é caracterizada por ser intensamente energética (Bamforth, 2003). Um dos primeiros passos realizados nesta etapa é a extração de sabores indesejáveis provenientes do lúpulo (Bamforth, 2003; Wunderlich & Back, 2009).

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) (Figura 4) é uma planta trepadeira responsável pelo sabor amargo característico da cerveja. Esta planta é adicionada durante a preparação da cerveja, isto porque o lúpulo tem efeitos conservantes. Para além deste efeito conservante, o lúpulo possui substâncias farmacologicamente ativas, como por exemplo a indução do sono (Franco *et al.*, 2012).

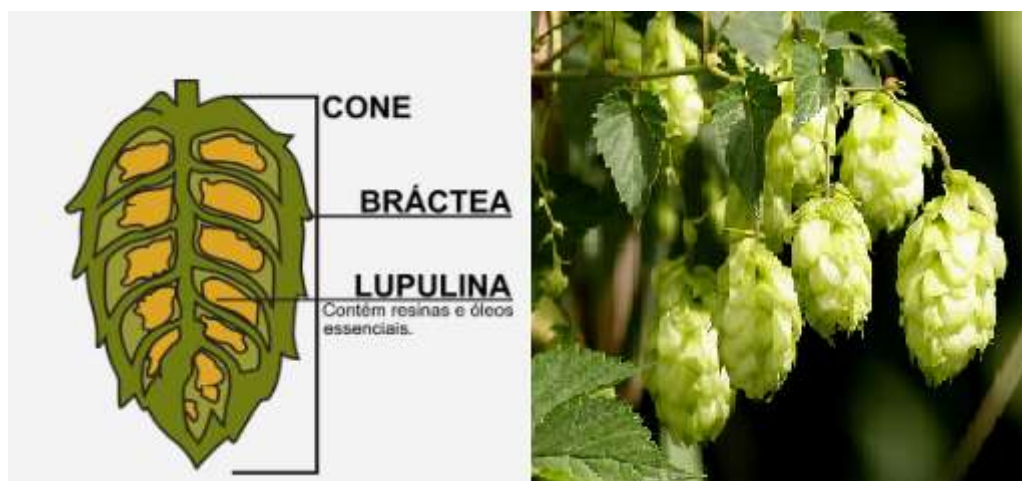


Figura 4- Morfologia do lúpulo, adaptado de <http://www.gruit.es>; <http://comofazercerveja.com.br>, 05/05/2014.

O lúpulo é abundantemente cultivado sendo a Alemanha e os Estados Unidos os maiores produtores (Priest & Stewart, 2006).

Nas grandes plantações de lúpulo, somente as plantas fêmeas não fertilizadas são cultivadas, devido à existência de cones de lúpulo que contém propriedades químicas essenciais para a fabricação da cerveja. As glândulas de lupulina também têm grande importância na fabricação da cerveja, com exceção dos taninos. As glândulas de lupulina estão localizadas entre o eixo e a bráctea (Wunderlich & Back, 2009; Nikolić & Van Breemen, 2013). No fabrico da cerveja, o resíduo do lúpulo permanece após a fervura. Durante esta fase são libertados alguns compostos voláteis que podem evaporar dependendo do maior ou menor grau de ebulição. O lúpulo ferve em média durante uma hora e tende a perder todos os seus óleos. O lúpulo possui uma mistura complexa de óleos essenciais e de acordo com as suas características após a lupulagem podem ser adicionados à cerveja. Por esta razão, na Europa durante o fabrico da cerveja, uma percentagem do lúpulo é retido para posterior adição nos últimos minutos de fervura, desta forma é conservada uma parte dos óleos essenciais com o objetivo de fornecer à cerveja o aroma característico. A fervura para além de extrair substâncias do lúpulo permite que o mosto fique mais ou menos concentrado dependendo da taxa de evaporação que pode variar entre 4 a 12%. Esta fase permite descartar as moléculas indesejadas que se formam no aroma e que são provenientes da inativação de enzimas que possam ter sobrevivido após a maceração e esterilização do mosto (O'Rourke, 2003^b; Bamforth, 2003; Wunderlich & Back, 2009).

No início da ebulição dá-se a inativação enzimática, ficando as enzimas inativas a uma temperatura de 50-75°C, e dá-se também, a esterilização do mosto atingindo uma temperatura acima dos 90°C com o objetivo de destruir grande parte dos microrganismos. Após o início da ebulição dá-se a isomerização de cerca de 90% dos α -aminoácidos para iso- α -aminoácidos (O'Rourke, 2002^a). Ainda na fase de ebulição do mosto é possível que se formem compostos que conferem sabores desagradáveis, como o DMS. Este composto desempenha um papel fundamental no aroma de muitos legumes cozidos. Em contrapartida em sumo de frutas ou cervejas pode ser a causa de um *off-flavour* (Scherb *et al.*, 2009).

O DMS é um tioéter e é o principal composto volátil de enxofre formado, contribui para o aroma desagradável de bebidas e alimentos e desempenha um papel importante no sabor da cerveja. No intervalo de 50-100 mg/L, o DMS contribui positivamente para o sabor da cerveja, mas quando o seu teor é superior a 100 mg/L pode dar origem a um sabor e cheiro desagradável à cerveja como por exemplo cheiro ou sabor a couve (Marconi & Fantozzi., 2011).

O DMS é um volátil importante na qualidade do malte. Quando o malte é seco, o precursor inativo, S-metil metionina, que é formada durante a germinação, é convertida num precursor ativo que poderá envolver apenas uma mudança estrutural, sendo uma parte destruída pelo calor, por isso os maltes que são sujeitos a uma leve secagem contêm maior quantidade deste precursor do que os maltes que sofrem uma secagem mais intensa (Gebremariam *et al.*, 2013). No fim da ebulição ocorre a libertação de grande parte do DMS, assim como, concentração do mosto, máximo de isomerização, perda de óleos aromáticos, aumento da coloração, redução dos níveis de azoto e redução do pH (O'Rourke, 2002^a).

Desde as primeiras cervejas produzidas até as atuais verificaram-se muitas modificações na sua produção. Existem muitos estilos de cerveja apresentando aromas característicos provenientes do país em que é produzida. No entanto, a produção de cerveja implica sempre a utilização de levedura. Existem dois tipos de leveduras usadas na cerveja que são classificadas de acordo com o comportamento da levedura quando ocorre a floculação. O primeiro tipo de leveduras são as de alta fermentação usadas na fabricação das cervejas Ale. O segundo tipo de leveduras são as de baixa fermentação que são usadas na fabricação das cervejas, Lager. Ambas têm temperaturas de fermentação diferentes (Lodolo *et al.*, 2008).

A espécie *Saccharomyces sensu stricto* contém uma das mais importantes espécies usadas nas indústrias alimentares denominada de *S. cerevisiae*, esta levedura é

responsável pela fermentação do vinho, pão, alguns tipos de cerveja (Ale e Wiess) e bebidas alcoólicas produzidas através da fermentação do arroz. A espécie de levedura *Saccharomyces bayanus* é responsável pela fermentação de alguns tipos de vinhos e cidra e a levedura *Saccharomyces pastorianus* é responsável pela fermentação da cerveja Lager (Lodolo *et al.*, 2008).

A cerveja resulta da fermentação do mosto proveniente da cevada maltada juntamente com a levedura. As leveduras têm como função nesta fase converter os açúcares do mosto em etanol e dióxido de carbono, contribuindo desta forma para a formação de novos compostos do aroma na cerveja (Rainieri *et al.*, 2009).

A temperatura de fermentação e a pressão são parâmetros importantes durante o processo de fermentação. Aumentando a pressão há redução da propagação da levedura e diminui, conseqüentemente, a formação de produtos secundários. A fermentação pode também ser controlada pela temperatura. O controlo entre o mosto e a levedura permite a sedimentação para a clarificação da cerveja verde no final da fermentação, havendo fermentação dos açúcares com conseqüente formação de álcool. Os extratos residuais devem ser desprezados no fim da produção da cerveja porque diminuem a digestibilidade. O extrato residual proveniente da cerveja verde ronda uma média de 6 a 10% assegurando a formação de CO₂ durante a maturação.

É importante ter em conta o valor de pH, porque este deve diminuir de 5,6 para 4,5 durante a fermentação. O meio ácido previne as contaminações na cerveja final. Na maturação, os compostos voláteis como os aldeídos e compostos de enxofre são removidos pelo CO₂ da espuma da cerveja. O acondicionamento a temperaturas na ordem dos 0°C ou inferior e da cerveja congelada a 2°C permite uma maior clarificação e estabilização da cerveja. Os resíduos provenientes da levedura devem ser rejeitados se não forem necessários para a produção da mesma. As células mortas durante a decomposição libertam substâncias que podem influenciar negativamente o sabor e a estabilidade da cerveja (Wunderlich & Back, 2009).

As leveduras responsáveis pela floculação reproduzem-se assexuadamente. A floculação é processo reversível e dependente de cálcio em que há uma adesão das células a formarem flóculos. Após a formação, os flóculos são separados rapidamente por sedimentação (leveduras Lager), ou então sobem à superfície (leveduras Ale). A floculação tem grande importância na indústria cervejeira e não só, uma vez que, oferece de modo eficaz e favorável ao meio ambiente uma forma simples e sem custos de separar as células de leveduras no final da fermentação. Uma forte e completa floculação são características desejadas para a levedura no fabrico de cerveja, no entanto as

leveduras não devem flocular a meio da fermentação. A floculação prematura (antes do mosto estar completamente atenuado) pode levar à geração de *off-flavours* (Verstrepen *et al.*, 2003). Um atraso ou mesmo a falta da floculação pode causar problemas de filtração, ocorrendo, também, problemas na obtenção de uma cerveja com uma espuma brilhante, além disso, o excesso de levedura no envelhecimento da cerveja pode originar a perda do aroma por autólise da levedura (Soares, 2009).

As técnicas para a produção da cerveja Ale foram as primeiras a serem realizadas. O mosto é habitualmente fermentado a uma temperatura média de 20 a 25°C. As leveduras permanecem em suspensão durante a fermentação e no final do processo estas incorporam-se nas bolhas de CO₂ que se formam na espuma sendo transportadas para a superfície do mosto. O processo de fermentação dura alguns dias ficando depois, a cerveja apta para consumo. Em muitos casos é aproveitada a espuma dos melhores lotes de cerveja para a fermentação de outras cervejas, atuando como fermento natural (Rainieri *et al.*, 2009).

As cervejas Ale são mais aromáticas, apresentam forte paladar amargo de lúpulo e são em geral escuras. Totalizam 5% da produção mundial, que se concentra na Alemanha, Inglaterra e Bélgica e contém um teor alcoólico em volume de 3 a 4%.

As cervejas *Lager* são mais leves e apresentam diversas graduações alcoólicas. São as mais comuns em todo o mundo.

As cervejas *Pilsen* ou *Pilsner*, originárias da cidade de Pilsen na Boêmia, República Checa, são cervejas encorpadas e de sabor forte. Em Portugal e em outros países é mais leve, devido à utilização de milho e arroz. Tem cerca de 5 graus alcoólicos (leve), e deve ser consumida entre 4 e 6°C. Todas as marcas portuguesas produzem pelo menos uma variedade de *pilsen*.

De seguida apresenta-se, resumidamente, as características de alguns tipos de cerveja, (disponível em <http://www.sindicerv.com.br>, 30/04/2014):

- *Stout* e *Porter* são cervejas pretas e são preparadas com adição de maltes torrados.
- *Weissbier* é uma cerveja clara que contém geralmente malte de trigo e em que a levedura permanece em suspensão o que lhe confere um aspeto turvo.
- *München* pode ser uma cerveja clara ou escura e com leve paladar picante de malte e café, contém 4 a 5 graus de álcool e tiveram origem na cidade de Munique na Alemanha.

- *Malzbier* é uma cerveja escura e doce, que deveria ser produzida com malte mais tostado. Pode incluir caramelo na fórmula.
- *Bock* é uma cerveja mais forte com 5 a 7 graus alcoólicos e de cor avermelhada. Leva maltes especiais, torrados e caramelo, que resulta num sabor menos amargo.
- *Lager Americana* é uma versão da *pilsen*, muito leve, quase sem lúpulo e praticamente sem sabor. Denomina-se também, *Standart Lager Americana*.

Os diferentes tipos de cerveja e sua classificação resumem-se na Tabela 4.

Tabela 4- Resumo dos diversos tipos de cerveja, adaptado, <http://www.sindicerv.com.br>.

Cerveja	Origem	Coloração	Teor alcoólico	Fermentação
<i>Pilsen</i>	Alemanha	Clara	Médio	Baixa
<i>Stout</i>	Inglaterra	Escura	Alto	Geralmente baixa
<i>Porter</i>	Inglaterra	Escura	Alto	Alta ou Baixa
<i>Weissbier</i>	Alemanha	Clara	Médio	Alta
<i>Münchem</i>	Alemanha	Escura	Médio	Baixa
<i>Bock</i>	Alemanha	Escura	Alto	Baixa
<i>Malzbier</i>	Alemanha	Escura	Alto	Baixa
<i>Ale</i>	Inglaterra	Clara e avermelhada	Médio ou Alto	Alta
<i>Ice</i>	Canada	Clara	Alto	Baixa

1.5 Análise por SPME-GC-MS de compostos voláteis

1.5.1 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica que permite separar compostos voláteis em amostras complexas. O cromatógrafo gasoso, instrumento usado para a aplicação desta técnica, usa uma corrente de gás quimicamente inerte (fase móvel) que transporta os componentes da mistura a analisar na forma de gás ou de vapor e passa através de uma fase estacionária acondicionada numa coluna. A separação dos compostos em estudo resulta das propriedades físicas e químicas e da interação com o material do interior da coluna (Bélanger *et al.*, 1997; Tranchida *et al.*, 2014).

1.5.1.1 Caraterização de um cromatógrafo gasoso

Um equipamento básico de GC é constituído por: um sistema de fornecimento de gases; um injetor; uma coluna cromatográfica mantida num forno de aquecimento; um detetor e um sistema para o tratamento de dados. Para que o sistema funcione como esperado, o injetor, a coluna e o detetor têm de estar aquecidos a uma temperatura controlada (Figura 5) (Pinto, 2011).

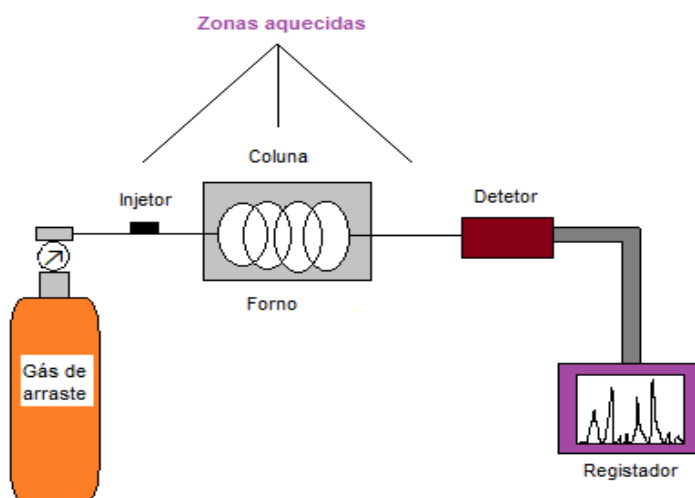


Figura 5- Caraterização de um cromatógrafo gasoso.

Dependendo do tipo de detetor, o gás de arraste poderá ser o ar, hélio, azoto, hidrogénio, ou ainda uma mistura de árgon com metano. Os gases mais comuns em GC são o hélio e o hidrogénio, sendo este último gás o mais eficiente, fornecendo uma melhor separação sendo mais barato que o hélio. Mas apresenta como desvantagem ser altamente inflamável (Dondelinger, 2012)

O injetor normalmente constituído por um cilindro metálico contendo um cilindro em vidro (*liner*) permitindo a introdução da amostra a analisar no seio do gás. A injeção da amostra é feita por meio de seringas apropriadas através de um septo, que mantém o interior do injetor separado do seu exterior. A temperatura a que se encontra o injetor deve ser suficiente de modo a assegurar a rápida volatilização dos componentes da mistura a analisar. As temperaturas mais utilizadas devem rondar os 200 °C a 300 °C. (Pinto, 2011; Escuderos, 2011).

A coluna cromatográfica é geralmente considerada como órgão vital de um GC. Sendo a cromatografia uma técnica separativa, a possibilidade de êxito de uma análise está fortemente ligada ao poder de separação da coluna utilizada. As colunas de GC são, normalmente, enroladas em hélice por questões de economia de espaço, situadas dentro de um forno de temperatura regulável e ligadas ao injetor e ao detetor por meio de juntas estanques adequadas. Visto que a velocidade, a eficácia e a reprodutibilidade da separação são extremamente dependentes da temperatura, a sua exata regulação é um parâmetro fundamental neste tipo de cromatografia. As temperaturas normalmente seleccionadas vão desde a temperatura ambiente até 300°C – 350°C, dependendo do tipo de fase estacionária e da natureza dos compostos que se pretende analisar (Fernandes, 1993)

Os detetores têm como funcionalidade medir o sinal elétrico proporcional à quantidade detetada, ou seja, mede uma determinada propriedade do vapor que o atravessa e emite um sinal que é função da composição deste. Existem detetores universais e outros que são específicos para determinadas substâncias. O detetor de eleição para o presente trabalho será o detetor de massa (MS) que permite detetar quantidades inferiores a 10^{-2} g (em modo de iões seleccionados – SIM). Este detetor é universal e fornece o espectro de massa de cada banda cromatográfica (Pinto, 2011).

O sinal elétrico proveniente do detetor é transmitido e registado eletronicamente, sendo os dados gravados para posterior tratamento. O conjunto de sinais e suas intensidades *versus* o tempo de análise originam o cromatograma. Os sistemas atuais permitem o armazenamento de informações importantes para posterior interpretação qualitativa e quantitativa dos resultados obtidos. Através de programas informáticos,

estes sistemas possibilitam o controlo do aparelho e das condições cromatográficas do mesmo (Pinto, 2011).

1.5.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

A função de um espectrómetro de massa fundamenta-se no princípio que partículas carregadas, movendo-se num campo elétrico ou magnético, podem ser separadas de acordo com a sua massa, ou mais precisamente, com a sua relação massa/carga (m/z). O processo requer uma fase inicial em que as moléculas da amostra são ionizadas e fragmentadas. Após a sua separação, é feito um registo dos iões formados, em que posteriormente é relacionado as suas abundancias relativas com os respetivos valores de m/z , por espectro de massa, que representa uma espécie de “impressão digital” química da substancia (Fernandes, 1993).

GC pode ser combinada a diferentes sistemas de deteção. O acoplamento de um cromatógrafo gasoso ao detetor MS combina as vantagens de ambos os métodos (Chiaradia *et al.*, 2008).

Num sistema de GC-MS, a amostra a analisar é introduzida na coluna na forma habitualmente utilizada em GC, os componentes da amostra vão sendo separados ao atravessar essa coluna e apresentam-se isoladamente e a tempos diferentes na câmara de ionização do MS a qual se encontra, tal como as outras partes do espectrómetro, em alto vácuo. Uma vez na câmara de ionização, todas as moléculas são ionizadas e fragmentadas de uma forma reprodutível e os fragmentos formados são filtrados pelo analisador de massa de acordo com a relação m/z . Seguidamente esta relação é captada pelo coletor de iões onde vão originar um sinal elétrico proporcional ao sinal detetado. É usada uma unidade computarizada de aquisição e processamento de dados que regista esses sinais elétricos transformando-os num cromatograma (Fernandes, 1993).

1.5.3 Análise por “Headspace” – microextração em fase sólida (HS-SPME)

A SPME é usada em operações que criam um elo entre a matriz química e o instrumento analítico, sendo maioritariamente usado em GC. Esta técnica não utiliza solventes, tem alto poder de concentração, sendo adequada com a sensibilidade dos

detetores de GC, é aplicada a muitos tipos de compostos e facilita o transporte do material extraído para o cromatógrafo (Pawliszyn, 2000; McNair & Miller, 2009; De Schutter *et al.*, 2008).

A SPME é uma microtécnica de extração e pré-concentração de analitos que ocorrem numa escala bidimensional. O dispositivo usual neste tipo de técnica consiste num bastão de fibra ótica, de sílica fundida de 100 mm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente (Figura 6). A extração ocorre quando a secção recoberta mergulha na amostra, ou no seu *headspace*. O dispositivo da fibra que não pode ser manipulado diretamente é manuseado com um amostrador e a fibra é presa a um êmbolo. Na extremidade oposta ao êmbolo, o tubo hipodérmico fica exposto, isto para proteger a fibra, funcionando como agulha para perfurar o septo (Valente & Augusto, 2000).

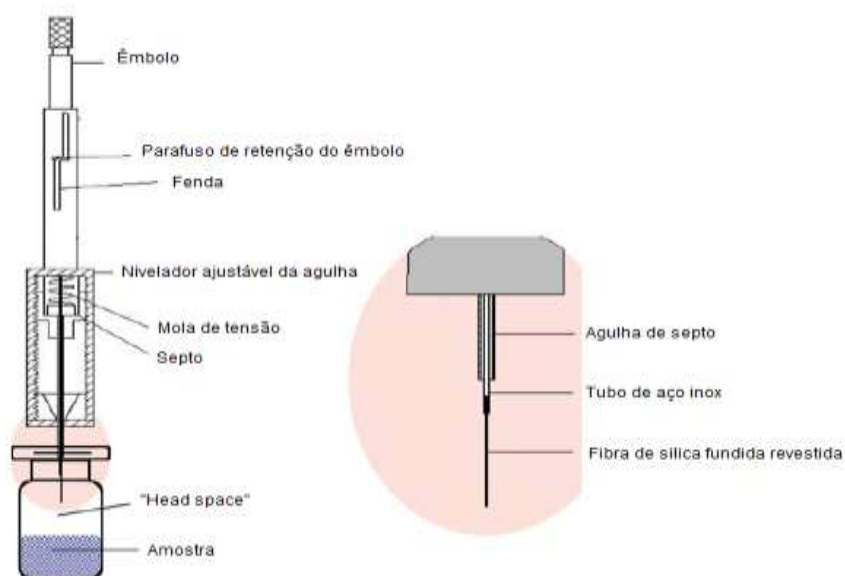


Figura 6- Fibra de SPME, adaptado, Almeida *et al.*, 2004.

A fibra é retraída na agulha, o septo do frasco onde se encontra a amostra é perfurado e a fibra é posta em contacto com a amostra. Quando termina o tempo de extração, a fibra é novamente retraída, a agulha é retirada do septo e é transportada imediatamente para o CG. O septo do injetor é perfurado com a fibra retraída, esta é exposta para dessorção térmica. Terminada a dessorção a fibra é retraída e a agulha é retirada. Após todo o procedimento é importante que a agulha seja vedada com um

pedaço de septo, de modo a evitar contaminações da fibra (Figura 7) (Valente & Augusto, 2000).

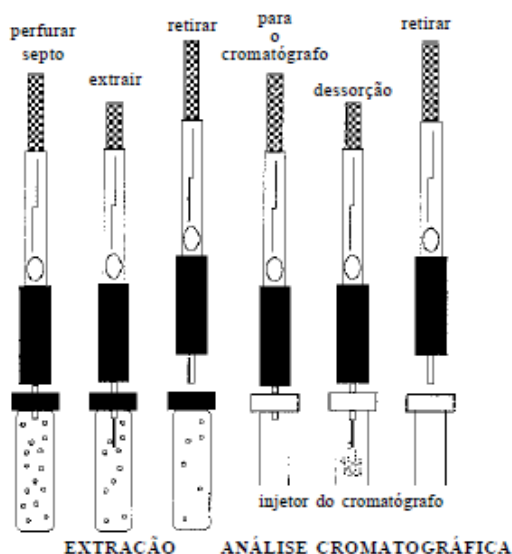


Figura 7- Adsorção (extração) e dessorção da fibra, adaptado, Valente & Augusto, 2000.

A técnica de HS-SPME é uma técnica rápida sensível e potente que oferece vantagens sobre outras técnicas de preparação de amostras. A presente técnica permite eliminar o uso de extração por solventes e permite a extração e a concentração de determinados passos de modo a serem executados simultaneamente. Esta técnica tem sido usada para a análise de compostos voláteis de uma grande variedade de produtos alimentares para fins de classificação e caracterização (Xiao *et al.*, 2011). A técnica de *headspace* permite modificações na amostra como por exemplo o pH, força iônica, entre outros, e isto sem danificar o filme polimérico. Pode ser também usada como uma técnica de amostragem não destrutiva permitindo a avaliação de diferentes condições experimentais (Krüger *et al.*, 2009).

1.6 Objetivos do trabalho

Esta dissertação teve como objetivos estudar o perfil de voláteis de diferentes tipos de malte e, também, avaliar a influência das condições de maltagem, especialmente da temperatura de estufagem na fração volátil e na composição em DMS do malte *pilsen*. Deste modo, para atingir estes objetivos foram identificados os compostos voláteis de maltes produzidos a nível industrial, incluindo o malte *pilsen*, o malte de trigo e maltes especiais, como o malte caramelo e chocolate. Foram ainda analisados maltes *pilsen*, provenientes de duas variedades diferentes de cevada, produzidos em condições controladas numa minimaltaria. De todos os lotes de malte recolheu-se uma amostra no início e no fim da etapa de estufagem e uma amostra de malte final para conhecer a evolução dos voláteis ao longo da maltagem nos diferentes lotes e avaliar o impacto da temperatura de estufagem na fração volátil. Quer na análise dos compostos voláteis quer na quantificação de DMS utilizou-se uma extração por HS-SPME seguida por análise por GC-MS.

2. Materiais e métodos

- 2.1 Amostragem**
- 2.2 Materiais e reagentes**
- 2.3 Preparação da amostra**
- 2.4 Cromatografia gasosa com detecção de massa**
- 2.5 Avaliação da eficácia analítica**
- 2.6 Análise estatística dos resultados obtidos com GC-MS**

2.1 Amostragem

As amostras de malte foram todas fornecidas pela empresa cervejeira UNICER-Bebidas de Portugal SGPS S.A. Leça de Balio. Estas amostras incluíram 2 lotes de malte *pilsen* e de malte de trigo, assim como, 2 lotes de maltes especiais, de caramelo e de chocolate produzidos a nível industrial.

Adicionalmente foram recolhidas, ao longo da maltagem, amostras de 7 lotes diferentes de malte *pilsen* produzidos numa minimaltaria piloto, em condições controladas. Na produção destes lotes de malte foram utilizadas duas variedades de cevada, a *Quench* e *Tipple* e duas temperaturas diferentes de estufagem. As principais etapas da produção de malte provenientes do processo de minimaltaria encontram-se esquematizadas na Figura 8:

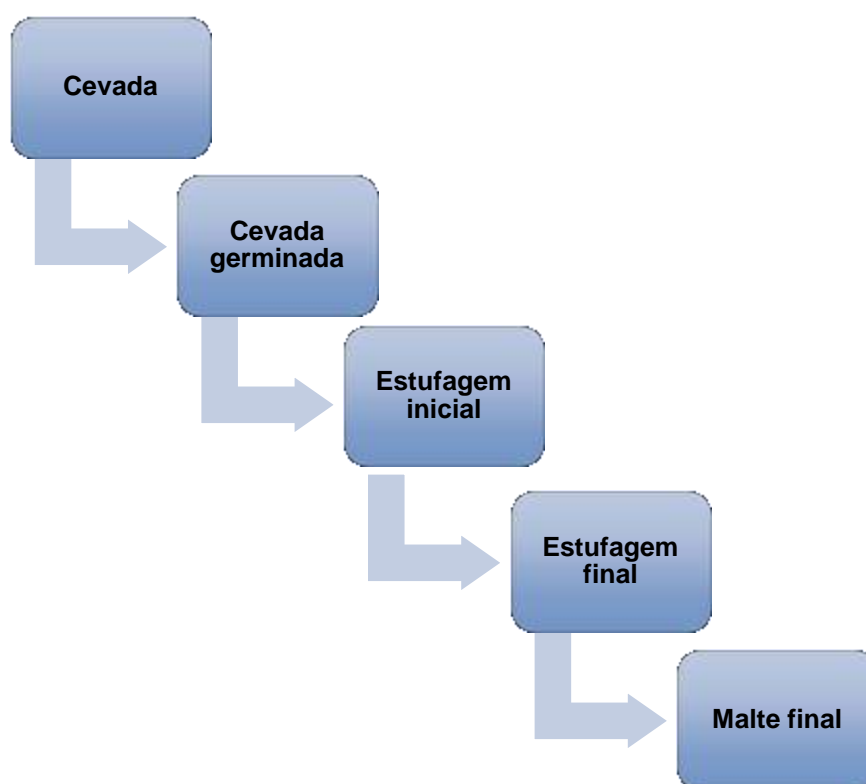


Figura 8 - Principais etapas da produção de malte.

Foram analisados 7 lotes de malte, designados por lotes A, B, C, D, E, F e G. De cada lote foram recolhidas amostras de malte no início e no fim da estufagem e de malte final. A cevada utilizada nos lotes A e B foi da variedade *Quench* e nos restantes lotes C, D, E, F e G foi da variedade *Tipple*. Nos lotes B, C e D foi usada uma temperatura de estufagem (*curing*) 85°C que faz parte do programa de maltagem *standard* enquanto nos lotes A, E, F, e G foi usada uma temperatura de estufagem mais baixa, 75°C em vez de 85°C.

Todas as amostras de malte antes e após a análise foram conservadas no frigorífico a uma temperatura de 4°C.

Numa segunda etapa, procedeu-se à quantificação do DMS nos 7 lotes de malte recolhidos nas estufagens inicial, final e malte final. Nesta fase foi analisado mais um lote (H). O lote H pertence à variedade *Tipple* e foi preparado com um baixo teor de humidade apresentando no final da molha teores compreendidos entre 39 - 40% em vez de 44 - 45%. Neste último lote foi usada uma temperatura de 85°C num programa de maltagem *standard*.

O DMS antes da análise foi conservado à temperatura ambiente e depois da análise foi conservado no frigorífico a 4°C. O etil-metil-sulfureto (EMS) (Padrão interno) antes e após a análise foi conservado no frigorífico a uma temperatura de 4°C.

2.2 Materiais e reagentes

2.2.1 Materiais

Para a preparação da amostra foi usado um tamis com malha de 2 mm, Retsch®, test sieve, ISO 3310-1 Body 316L Mesh s-steel/RF S/N 10022025, Body: 200mm×50mm, um moinho Apolymix® PX-HFC 90D, uma balança analítica sartorius®, um vortex e uma pinça metálica.

Para a análise das amostras foram usados *vials* de 15 ml juntamente com um agitador magnético, um termómetro digital ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) e uma placa de aquecimento BL Barnstead. Thermolyne CIMAREC®. Foram ainda testadas duas fibras a divinilbenzeno-carboxeno-polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS) e a carboxeno-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS).

2.2.2 Reagentes usados para a análise de perfil de voláteis e para a quantificação do DMS

O NaCl usado para a preparação de uma solução a 20% foi obtido à Merck .

O DMS com grau de pureza $\geq 99\%$ e o EMS com grau de pureza de 96%, usado como padrão interno, foram adquiridos à Sigma-Aldrich

Foram utilizados na preparação das soluções mãe de DMS e EMS, água ultra pura, obtida através do sistema Seralpur pro 90 CN, existente em laboratório e cumprindo todos os requisitos para a utilização em HPLC, e álcool absoluto adquirido à Merck.

2.3 Preparação da amostra

2.3.1 Preparação da amostra para a análise de compostos voláteis do malte

Na preparação da amostra para a análise do perfil de voláteis, os grãos de malte que continham radículas foram passados num tamis com malha de 2 mm e aquelas que não foram separadas do grão através do tamis foram retiradas com uma pinça. Depois de tamisados, os grãos foram moídos num moinho com uma malha de 0,1 μ . Para as amostras que continham um maior teor de humidade usou-se uma malha de 1,0 μ de tamanho. Posteriormente foram pesados 3 g de amostra numa balança analítica para um *vial* de 15 ml que foi fechado. Este *vial* com o malte foi colocado num pequeno bloco acoplado a uma placa de aquecimento.

2.3.2 Preparação da amostra para a quantificação do DMS

Para a quantificação do DMS, foram usadas amostras de 8 lotes de malte provenientes de uma minimaltaria, processadas segundo a metodologia apresentada no ponto anterior, com a única diferença de que foram adicionados a cada um 15 μ l de EMS a 100 mg/L (padrão interno).

Inicialmente foram testadas diferentes condições experimentais usando uma solução de 4 ml de DMS a 100 mg/L adicionada de EMS com a mesma concentração conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições experimentais para a quantificação do DMS.

Teste	Quantidade de malte (g)*	EMS (µl)	DMS (µl)	Temperatura (min)	Adsorção (min)	Dessorção (min)
1	3	15	15	70	40	15
2	3	15	15	50	30	10
3	3	15	15	30	30	10
4	3	15	15	30	20	10
5	3	15	15	30	15	10
6	3	15	15	30	10	10
7	3	15	15	30	15	5

* Malte Pilsen

A presente tabela representa ensaios correspondentes às várias condições experimentais realizadas para a validação do método que será descrito mais a frente.

2.4 Cromatografia gasosa com detecção de massa

A análise cromatográfica foi realizada, recorrendo ao uso de um cromatógrafo gasoso Hp Hewlett packard Hp 6890N series-GC System equipado com uma porta de injeção *split/splitless* o qual está associado a um detetor seletivo de massa, da marca Agilent Technologies, modelo 5973 com câmara de ionização por impacto de eletrões (Figura 9). É usado como gás de arraste o hélio BIP, que corresponde ao mais alto grau de pureza e encontra-se comercialmente disponível a 99,9999%. A coluna usada para a separação dos compostos foi uma coluna capilar de sílica, marca Supelco® 24051, que suporta uma temperatura máxima de 320°C. Esta coluna tem um comprimento de 60 m e um diâmetro de 320 µm. A separação cromatográfica teve um fluxo constante de 1,2 ml/min.



Figura 9 – Técnica de HS-SPME e GC-MS.

2.4.1 Condições cromatográficas para a análise do perfil de voláteis

Para a análise dos voláteis dos maltes especiais e do malte *pilsen* proveniente da minimaltaria foram usadas as condições cromatográficas resumidas na Tabela 6 e na Figura 10.

Tabela 6- Condições cromatográficas utilizadas no perfil de compostos voláteis.

Rampa	°C/min	Temperatura °C	Retenção (min)	Tempo de corrida min
Inicial	0	33	2	2
Rampa 1	10	70	0	5,7
Rampa 2	4	200	0	38,2
Rampa 3	20	270	10	51,7

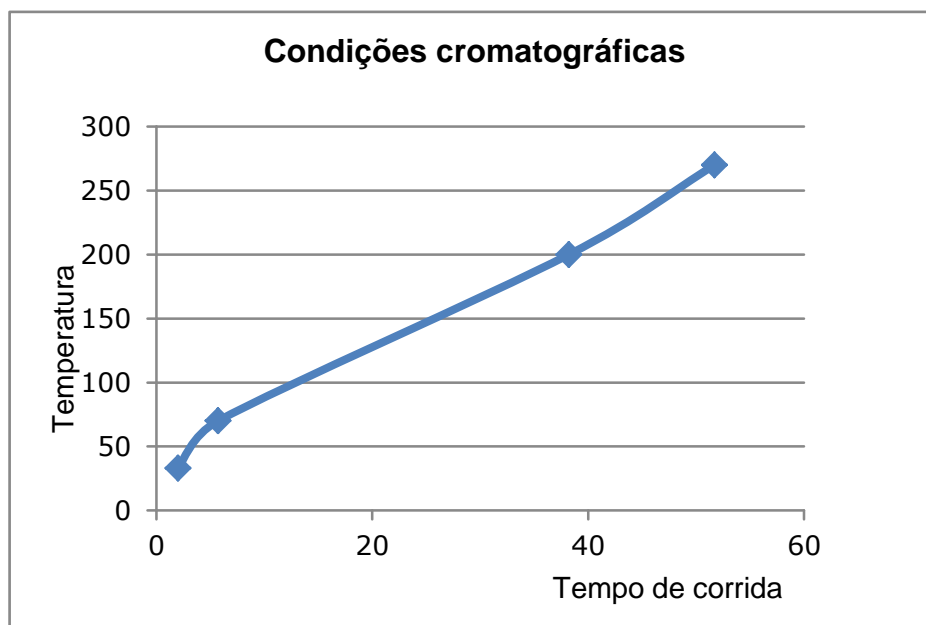


Figura 10.- “Rampa” utilizada na corrida cromatográfica utilizada na análise do perfil de voláteis.

As amostras de malte foram analisadas em duplicado e os compostos voláteis obtidos em cada cromatograma foram identificados em modo *full scan* pela biblioteca de espectros *wiley7n.L*, posteriormente os compostos foram agrupados por famílias químicas (aldeídos, cetonas, álcoois, aminas, amidas, ácidos carboxílicos, esterres, compostos furânicos, hidrocarbonetos, decanos, compostos fenólicos, pirazinas, piridinas, pirimidinas, DMS, derivados do DMS e outros). O tempo médio da corrida cromatográfica para o perfil de voláteis foi de 51 minutos.

2.4.2 Condições cromatográficas para a quantificação do DMS

A quantificação do DMS do malte proveniente da minimaltaria foi realizada utilizando as condições cromatográficas resumidas na Tabela 7 e no gráfico da Figura 11.

Tabela 7 - Condições cromatográficas utilizadas na quantificação do DMS.

Rampa	°C/min	Temperatura °C	Retenção (min)	Tempo de corrida (min)
Inicial	0	33	2	2
Rampa 1	10	70	0	5.90
Rampa 2	25	280	5.90	20

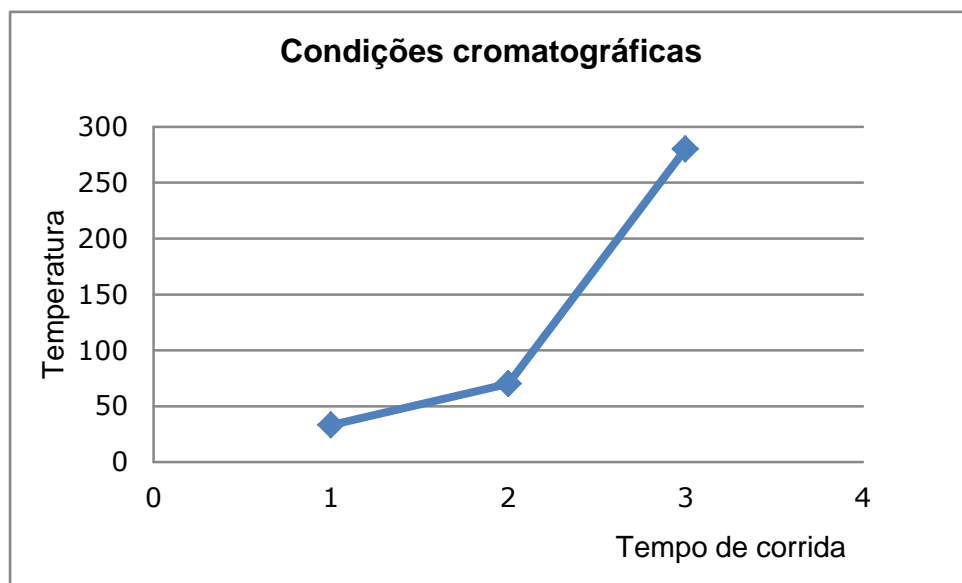


Figura 11 - “Rampa” utilizada na corrida cromatográfica utilizada na quantificação do DMS.

Os testes para a quantificação do DMS nas amostras de malte foram feitos em duplicado. Para a identificação do composto em questão, trabalhou-se em modo de iões seleccionados -*SIM* e fez-se a identificação dos iões do DMS e do EMS (Padrão interno). O tempo médio da corrida cromatográfica para a quantificação do DMS foi de 20 minutos. Os espectros de massa (m/z) destes compostos (DMS e EMS) podem ser visualizados nas Figuras 12 e 13.

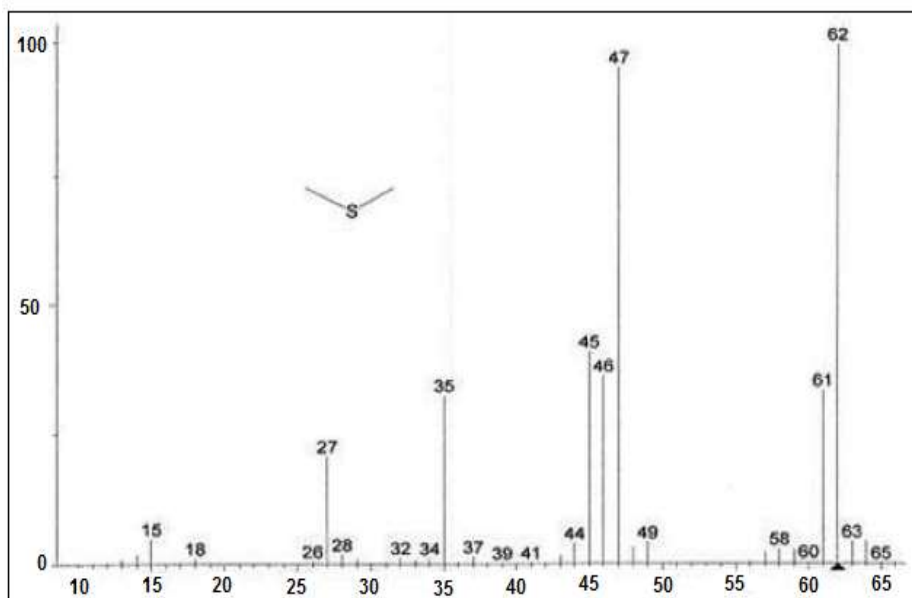


Figura 12 - Espectro de massa do DMS, adaptado, Marconi & Fantozzi., 2011.

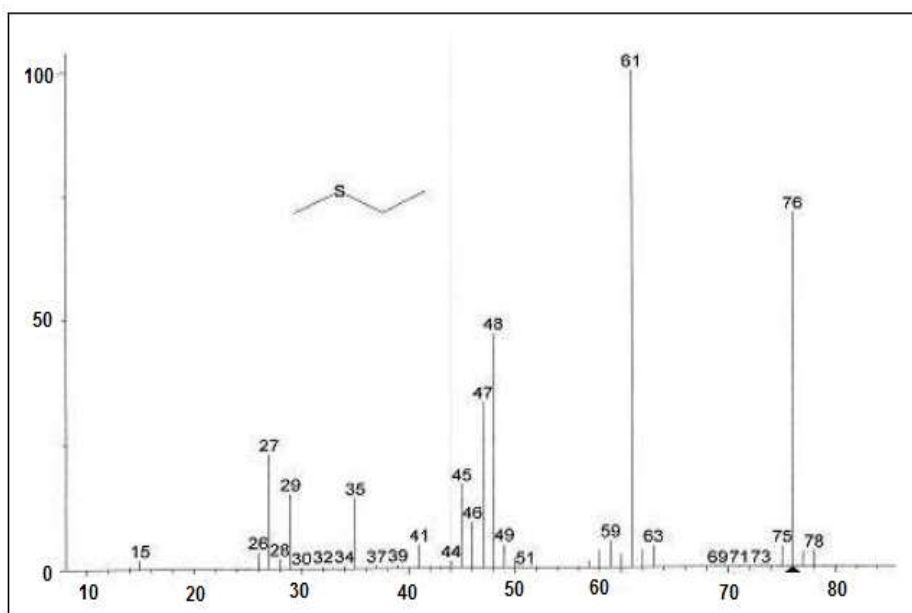


Figura 13 - Espectro de massa do EMS, adaptado, Marconi & Fantozzi., 2011.

Foram selecionados iões moleculares alvo para o DMS (62, 47) e para o EMS (61, 45, 35 e 27). Após a identificação no espectro dos picos base do DMS (62) e EMS (61) determinou-se o quociente entre a área do pico cromatográfico do DMS e a área do pico cromatográfico do padrão interno (EMS).

2.5 Avaliação da eficácia analítica

De forma a avaliar a eficácia do método de HS-SPME GC-MS determinaram-se alguns parâmetros analíticos, nomeadamente, as equações de regressão linear das curvas de calibração e a repetibilidade. A linearidade foi avaliada com 7 pontos de calibração para a gama de concentrações entre 100 mg/kg e 4000 mg/kg.

Avaliou-se a precisão do método pela avaliação da repetibilidade realizando 6 análises com a mesma amostra de malte selecionada aleatoriamente de um dos 8 lotes, sendo calculado o coeficiente de variação.

Efetuaram-se ensaios de recuperação com a amostra “estufagem final do lote A” para dois níveis de concentração: 50 µg/Kg e 150 µg/Kg. Os resultados do ensaio de recuperação exprimem-se em percentagem utilizando a seguinte fórmula:

$$Re\ c\% = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor real}} \times 100$$

2.6 Análise estatística dos resultados obtidos com GC-MS

Os valores das áreas obtidas a partir das análises cromatográficas foram estatisticamente analisados através do programa SPSS 22.0 para o Windows e pelo Microsoft Excel 2010.

Relativamente a análise de perfil de voláteis tanto dos maltes industriais como dos maltes *pilsen* provenientes da minimaltaria, agruparam-se os compostos por grupos químicos (aldeídos, cetonas, álcoois, aminas, amidas, ácidos carboxílicos, esteres, compostos furânicos, hidrocarbonetos, decanos, compostos fenólicos, pirazinas, piridinas, pirimidinas, DMS, derivados do DMS e outros), somaram-se as áreas dentro de cada família química, calculou-se a média da soma das áreas dos grupos químicos presentes na amostra e construíram-se gráficos para evidenciar a percentagem de cada grupo.

Nas amostras de malte provenientes da minimaltaria, analisaram-se com detalhe os 3 grupos químicos que mais influenciam o *flavour*, ou seja, os aldeídos, cetonas e álcoois para o malte das duas variedades de cevada (*Quench* e *Tipple*). Com as áreas dos picos cromatográficos efetuou-se uma ANOVA TWO-WAY para avaliar o efeito da temperatura e o efeito do processo de estufagem para os aldeídos, cetonas e álcoois que foram identificados. A análise estatística dos maltes da variedade *Quench* e *Tipple* foi realizada em separado. Este teste serviu para ver se existiam diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) nos aldeídos, cetonas e álcoois ao longo do processo de estufagem realizado a 75 e 85°C.

3. Resultados e discussão

- 3.1 Otimização das condições de extração dos compostos voláteis**
- 3.2 Perfil de voláteis em amostras de malte especiais**
- 3.3 Maltes *pilsen* provenientes da minimaltaria**
- 3.4 Quantificação do DMS nas amostras de malte *pilsen* provenientes da minimaltaria**

3.1 Otimização das condições de extração dos compostos voláteis

3.1.1 Otimização das condições para avaliar o perfil de voláteis

Para a validação do método foi necessário testar algumas condições experimentais, para tal, recorreu-se à literatura. Assim sendo, otimizou-se as condições de extração dos compostos voláteis pela técnica HS-SPME, baseado nos métodos propostos por Vandecan *et al.* (2010) e Dong *et al.* (2013) para a avaliação dos compostos voláteis do malte. Embora a matriz em estudo fosse a mesma, efetuaram-se algumas adaptações do método de modo a que fosse obtido apenas com uma fibra, um maior número de compostos voláteis para todas as amostras estudadas.

Testaram-se 2 fibras, a DVB-CAR-PDMS e a CAR-PDMS, neste teste usaram-se 3 g de malte com uma temperatura de adsorção de 70°C durante um período de 40 minutos seguindo-se um período 15 minutos de dessorção no GC-MS. Através da análise do gráfico da Figura 14 observou-se que os melhores resultados em termos de área absoluta foram obtidos com a CAR-PDMS. Posteriormente, testou-se adição de NaCl a 20% à amostra, conforme descrito por Dong *et al.* (2013), foram para tal adicionados 2 ml de uma solução de NaCl a 20% aos 3 g de amostra de malte, procedendo-se à extração conforme descrito anteriormente usando os dois tipos de fibra (gráfico da Figura 14).

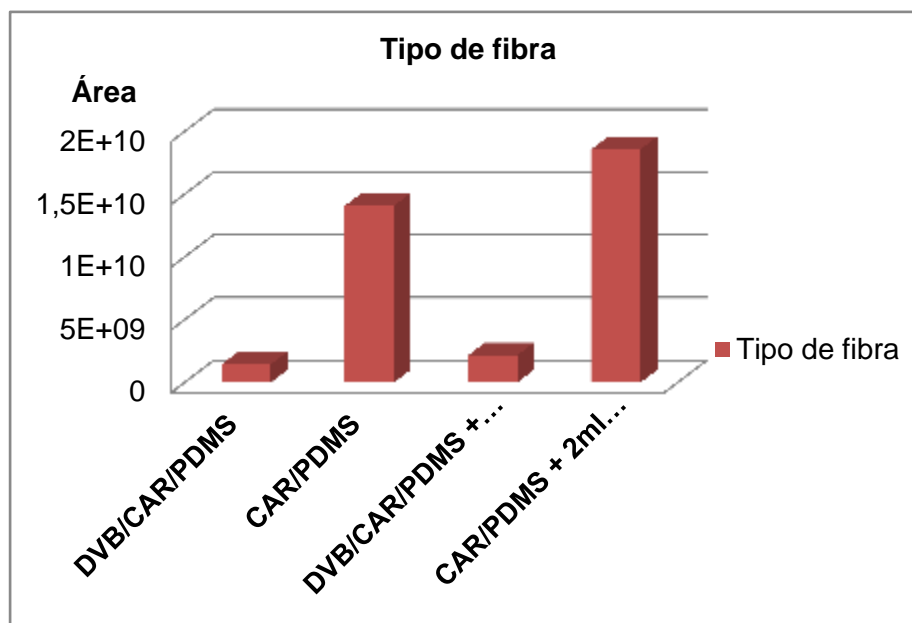


Figura 14 – Efeito do tipo de fibra na área total dos picos cromatográficos.

Pela análise do gráfico 14 verifica-se que a fibra CAR-PDMS com a adição do sal proporciona um aumento da área absoluta total relativamente à mesma sem adição de sal, este aumento contudo é pouco relevante. Pelo que se optou neste trabalho por usar a fibra CAR-PMS sem adição de sal o que implicava uma economia de tempo e reagente face à adição de sal.

Para a otimização da temperatura foram testadas 3 temperaturas de adsorção de 50°, 60° e 70° \pm 2°C, durante um período de 40 minutos de modo a verificar qual o seu efeito no processo de extração dos compostos voláteis. Os resultados referentes ao efeito da temperatura apresentam-se na Figura 15.

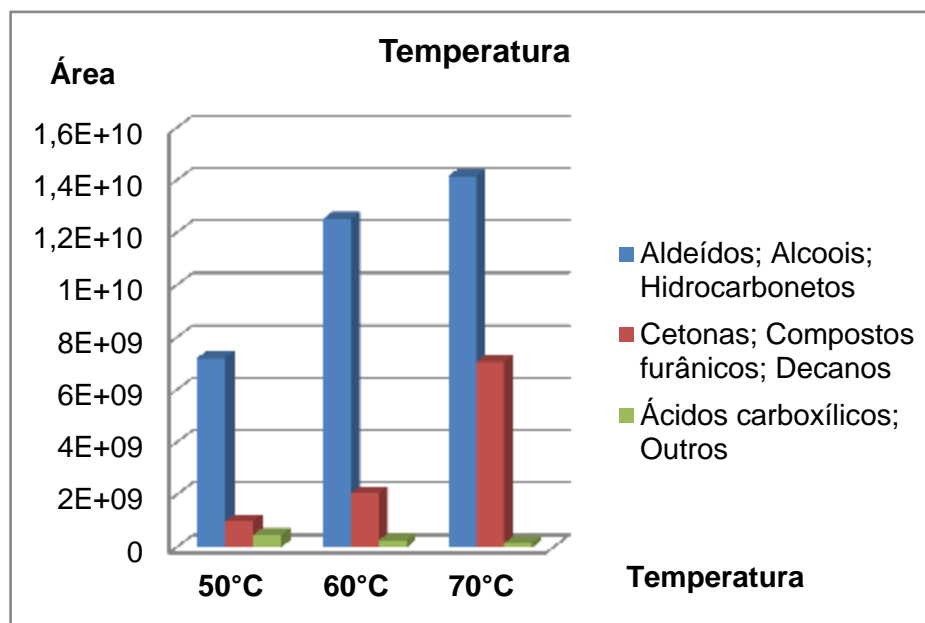


Figura 15 – Efeito da temperatura na área total dos diferentes grupos químicos.

De acordo com o gráfico da Figura 15, verificou-se que a soma total das áreas dos compostos voláteis para uma temperatura de 50°C foi inferior à observada com as temperaturas de 60° e 70°C. Com uma temperatura de 60°C verificou-se um aumento da área total relativamente à temperatura de 50°C, e uma diminuição relativamente à temperatura de 70°C. Em suma, com a temperatura de 70°C verificou-se um aumento em termos de área total relativamente às restantes temperaturas testadas.

Após a validação das condições procedeu-se do seguinte modo: Inicialmente pré equilibrou-se a amostra no *via* durante 5 minutos com constante agitação magnética de 2000 rpm com a temperatura de 70° ± 2°C. A fibra selecionada, a CAR-PDMS, foi introduzida no *via* através de um septo de borracha após os 5 minutos, com a agitação e temperatura referidas anteriormente. A adsorção foi realizada pela técnica de HS-SPME durante um período de 40 minutos (Figura 16). Após os 40 minutos a fibra foi introduzida no GC-MS a dessorver durante um período de 15 minutos.

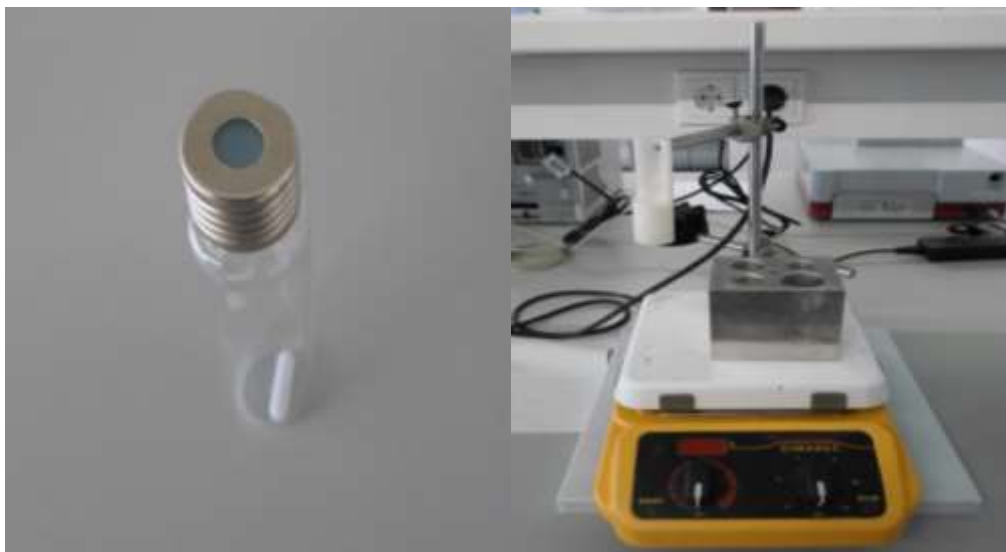


Figura 16 - Vial de 15 ml com septo de borracha e contendo uma barra magnética e a placa de aquecimento com suporte para colocar a fibra.

De seguida, foi calculada a repetibilidade do método, onde foram realizados no mesmo dia 6 ensaios consecutivos de uma amostra de malte escolhida aleatoriamente de modo a verificar a precisão do método. Os ensaios foram realizados com a amostra de malte pilsen (Tabela 8).

Tabela 8 - Repetibilidade do método, média, desvio padrão e coeficiente de variação da família de compostos analisados.

Repetibilidade ($n=6$)			
Compostos	Media (AU)	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Aldeídos	3,22E+09	379487439,7	11,8
Cetonas	3,41E+08	49702529,96	14,6
Álcoois	3,81E+09	347906085,1	9,1
Ácidos carboxílicos	9,30E+08	349750219,1	37,6
Compostos furânicos	2,02E+08	33710387,09	16,7
Hidrocarbonetos	7,47E+09	732212913,2	9,8
Decanos	1,44E+09	442807915,5	30,8
Compostos fenólicos	1,65E+07	1280590,047	7,8

A precisão pode ser calculada pela estimativa do desvio padrão relativo, conhecido também por coeficiente de variação através da medida do número de réplicas. A validação da precisão de métodos de análise de misturas complexas deverá ser aceite para valores de coeficientes de variação até 20% para substâncias estudadas em GC

(Ribani *et al.*, 2004). Através da análise da Tabela 8, verificou-se que no presente ensaio de repetibilidade o coeficiente de variação foi, em geral, inferior a 20% para a maioria dos grupos químicos o que significa que o presente método é preciso

3.1.2 Otimização das condições para a quantificação do DMS

A otimização do DMS foi baseada nas condições apresentadas por Niki *et al.* (2003) para a determinação de DMS e dimetilsulfonopropionato (DMSP) através da técnica de HS-SPME GC-MS, Vasquez-Landaverde *et al.* (2006) para a quantificação de compostos sulfúricos no leite e por Marconi & Fantozzi (2011) na determinação do DMS em amostras de cervejas. Atendendo ao facto da matriz em estudo apresentar características diferentes daquelas estudadas pelos autores citados, efetuaram-se algumas alterações de forma a adequar as condições para a presente quantificação.

Inicialmente testaram-se as mesmas condições usadas na análise do perfil de voláteis, ou seja, uma temperatura de adsorção de 70°C durante 40 minutos em HS-SPME e 15 minutos de dessorção no cromatógrafo com a fibra CAR-PDMS. Estas condições foram rejeitadas, visto que o ponto de ebulição do DMS é 37°C e à temperatura de 70°C acabava por degradar o composto em estudo. De seguida, foram testadas outras duas temperaturas com a mesma fibra, 50 e 30°C. Com a temperatura de 50°C, embora houvesse sinal analítico acabava por degradar o DMS. Com a temperatura de 30°C obteve-se um bom sinal analítico sem o risco da degradação do DMS (Figura 17).

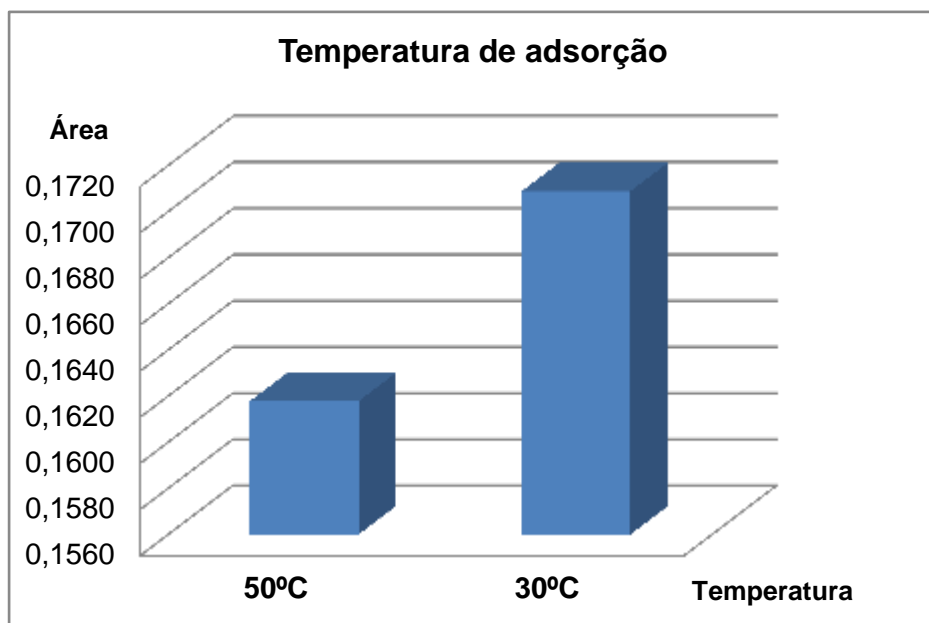


Figura 17 – Efeito da temperatura de adsorção na área total dos picos cromatográficos.

Foram também testados diferentes tempos de adsorção: 10, 15, 20 e 30 minutos. O melhor tempo de adsorção foi o de 15 minutos, tal como se pode observar no gráfico da Figura 18.

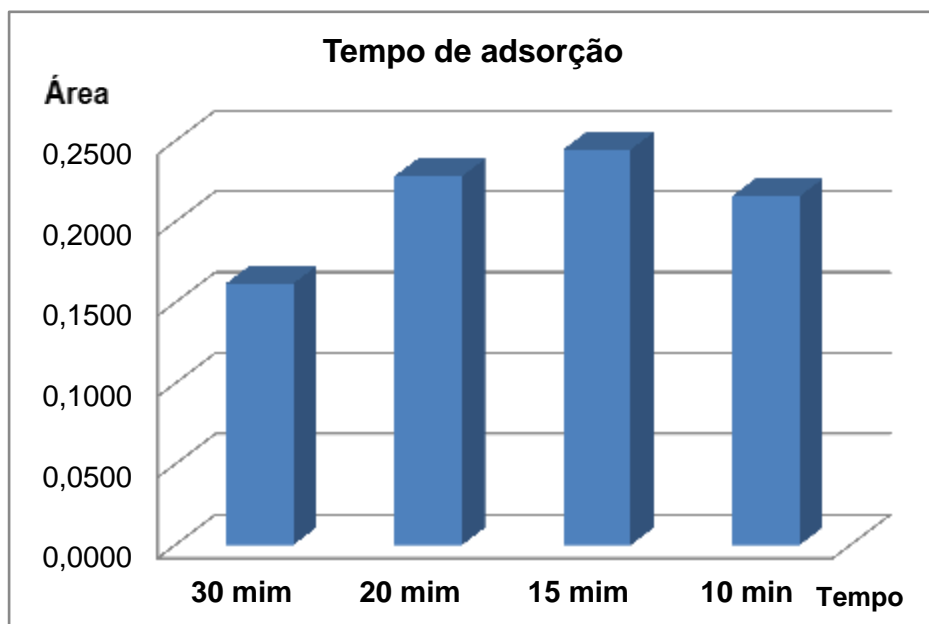


Figura 18 – Efeito do tempo de adsorção na área total dos picos cromatográficos.

Por último testaram-se dois tempos de dessorção, 5 e 10 min. Com o tempo de dessorção de 5 minutos obteve-se um sinal analítico mais intenso (Figura 19).

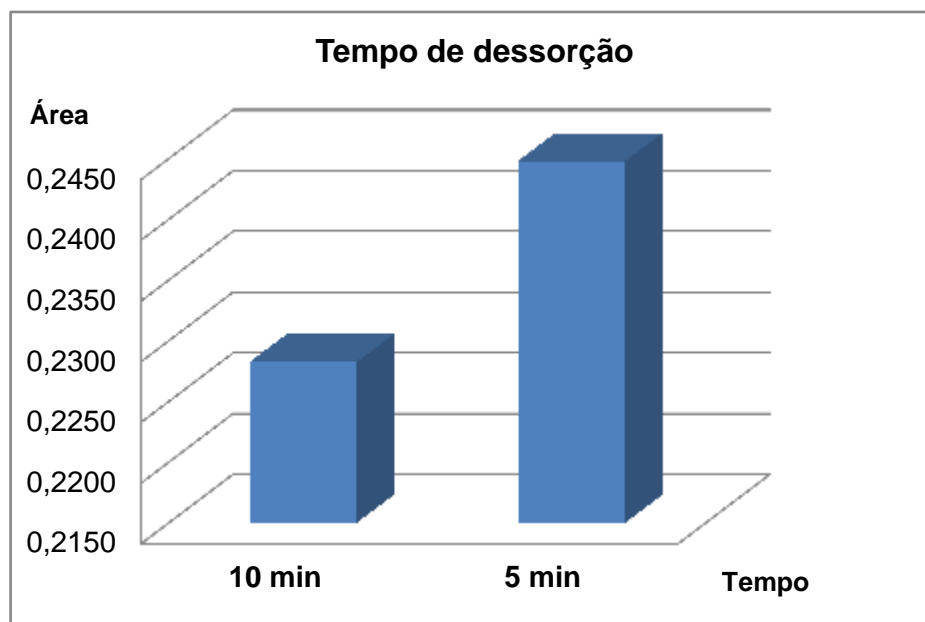


Figura 19 – Efeito do tempo de dessorção na área total dos picos cromatográficos.

Para a quantificação do DMS nas amostras de malte proveniente da minimaltaria, deixou-se a amostra no *vial* selado durante 5 minutos com agitação magnética de 2000 rpm, posteriormente inseriu-se a fibra CAR-PDMS através do septo do *vial* e deixou-se adsorver durante 15 minutos a uma temperatura de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, de seguida, introduziu-se a fibra no cromatógrafo durante 5 minutos.

Após a otimização das condições de extração, avaliou-se a repetibilidade do método. À semelhança da análise do perfil de voláteis, fez-se a análise de 6 amostras do mesmo malte (estufagem início do lote F) os resultados apresentam-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Repetibilidade do método, média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Repetibilidade (n=6)			
$\frac{\text{Área do DMS}}{\text{Área do EMS}}$	Media (AU)	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
0,109977			
0,122695			
0,137395			
0,119696			
0,143824			
0,127993			
	0,13	0,01	8,83

Através dos dados representados na tabela 9, verificou-se que o coeficiente de variação foi inferior a 10%, significando assim, que o método aplicado para a quantificação do DMS é preciso.

3.2 Perfil de voláteis em amostras de malte especiais

3.2.1 Maltes industriais 1º lote

Na primeira fase deste trabalho, analisaram-se dois lotes diferentes de malte *pilsen*, e malte de trigo, e dois lotes de maltes especiais, caramelo e chocolate (Figura 20). As análises foram realizadas em duplicado, utilizando o método otimizado em 3.1.



Figura 20 - Fotografia das amostras de malte *pilsen*, de trigo, caramelo e chocolate, respetivamente.

Os compostos voláteis foram identificados por GC-MS e foram agrupados por famílias químicas, em aldeídos, cetonas álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, hidrocarbonetos, compostos furânicos, pirazinas, pirimidinas, piridinas, aminas, decanos, compostos fenólicos, DMS, derivados do DMS e outros. Os resultados são apresentados na forma de gráfico circular de modo a facilitar a comparação do perfil de voláteis de cada tipo de malte (Figura 21).

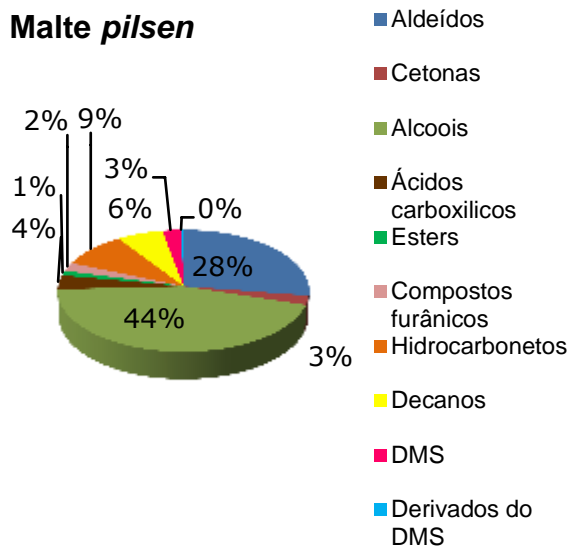
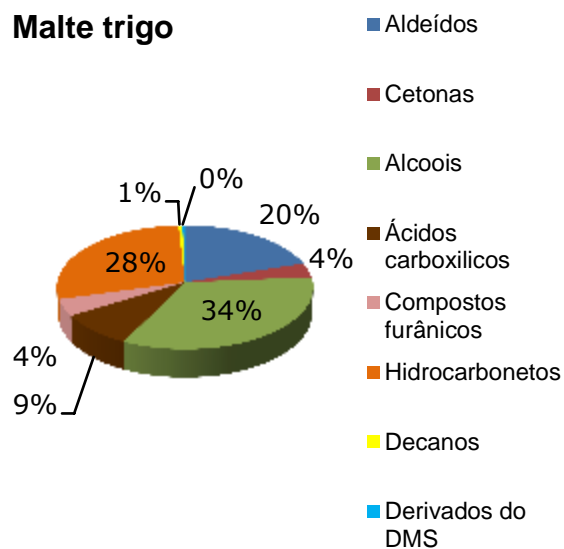
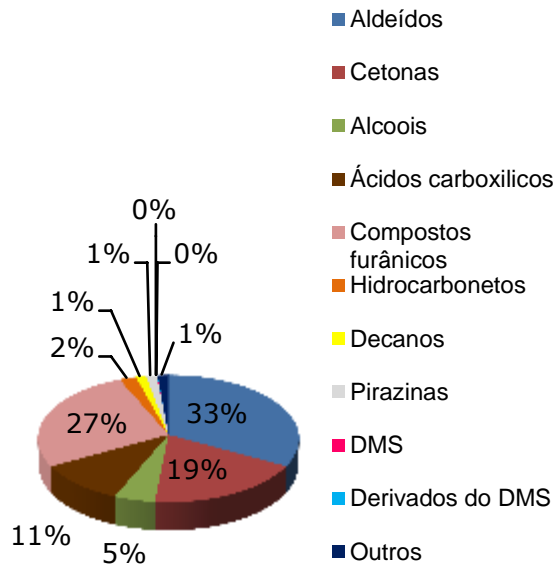
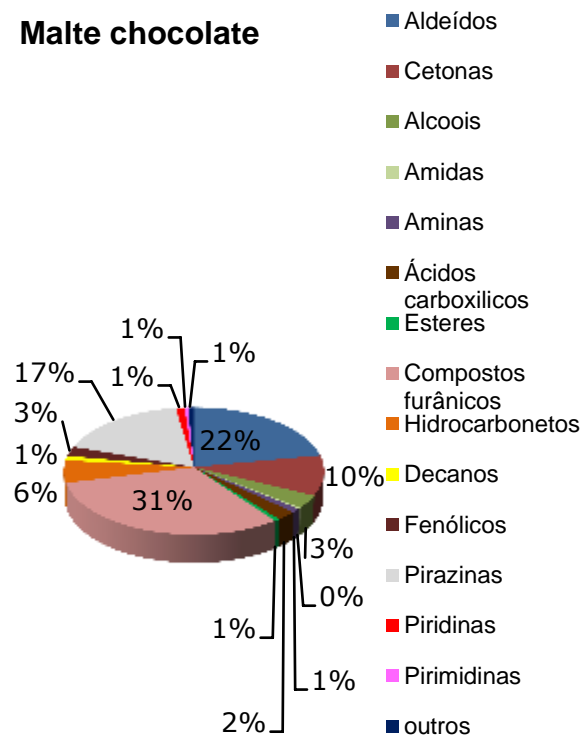
Malte pilsen**Malte trigo****Malte caramelo****Malte chocolate**

Figura 21 – Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis nos maltes especiais 1º lote.

A análise do gráfico da Figura 21 evidencia que o malte *pilsen* é rico em aldeídos e álcoois com teores de 28% e 44%, respetivamente. Verificou-se uma percentagem de 12% para os hidrocarbonetos e os restantes compostos (cetonas, ácidos carboxílicos, esterres, compostos furânicos, decanos e derivados do DMS) variaram de 1% a 9%.

No malte de trigo verificou-se que o grupo químico predominante eram novamente os álcoois tal como no malte *pilsen*, seguindo-se os hidrocarbonetos e aldeídos, com teores de 34%, 28% e 20%, respetivamente. Os restantes grupos químicos (cetonas, ácidos carboxílicos, compostos furânicos, decanos e derivados do DMS) variaram de 1% a 9%.

No malte caramelo os 3 grupos químicos que mais se destacaram foram os aldeídos, compostos furânicos e cetonas com percentagens de 33%, 27% e 19%, respetivamente. Os restantes compostos químicos (cetonas, ácidos carboxílicos, esterres, hidrocarbonetos, decanos, DMS e derivados do DMS) variaram entre 1% e 11%.

No malte chocolate verificaram-se algumas diferenças relativamente aos restantes maltes analisados. Este malte foi sujeito a uma temperatura de torrefação mais elevada, sendo perfeitamente justificável a presença de certos grupos químicos que não foram encontrados nos outros maltes, nomeadamente, as pirazinas, piridinas e pirimidinas. Os compostos predominantes nesta amostra foram os compostos furânicos, os aldeídos e as pirazinas com teores de 31%, 22% e 17%, respetivamente. Os restantes compostos (cetonas, álcoois, amidas, aminas, ácidos carboxílicos, esterres, hidrocarbonetos, decanos, compostos fenólicos, piridinas, pirimidinas e outros) variaram entre 1% a 10%.

Relativamente às quatro variedades de malte verifica-se que os álcoois são predominantes nas amostras de malte *pilsen* e de trigo, já nos maltes caramelo e chocolate encontra-se em pequenas quantidades. Nestas duas últimas amostras de malte verifica-se um acréscimo dos compostos furânicos, relativamente às duas primeiras amostras de malte que se encontram em pequenas quantidades.

3.2.2 Maltes industriais 2º lote

Efetou-se a análise de um 2º lote de maltes industriais, nomeadamente, malte *pilsen*, trigo, caramelo e chocolate (Figura 22).

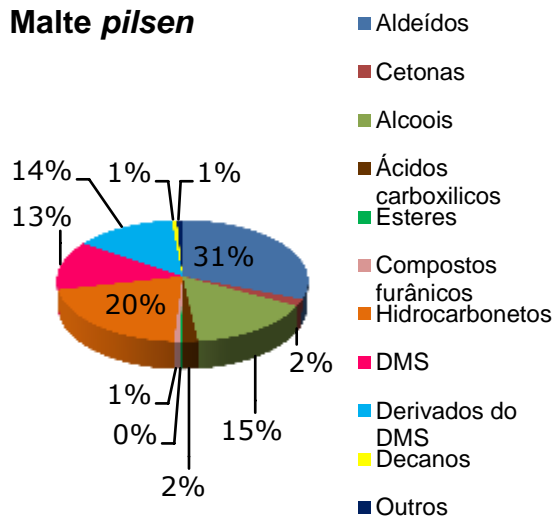
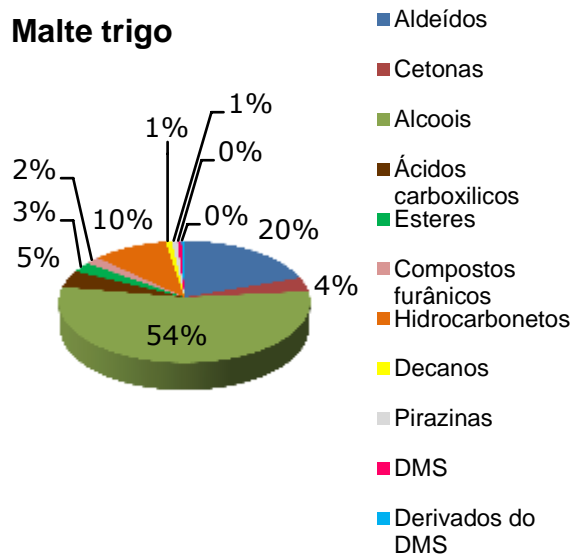
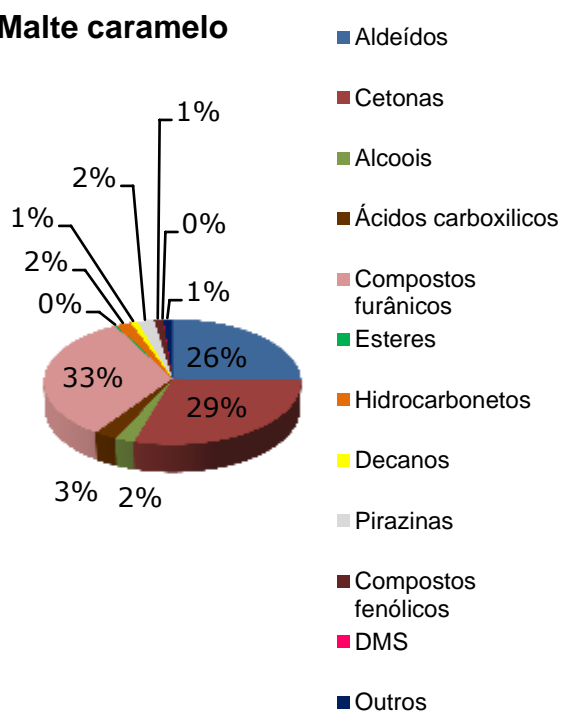
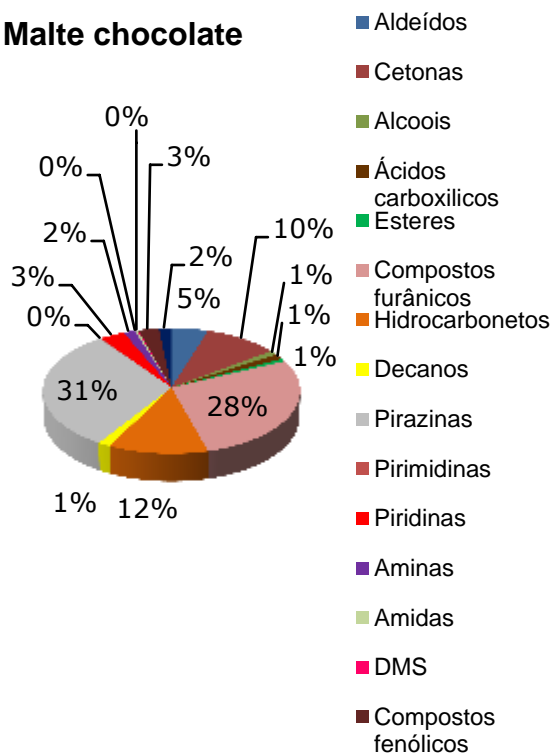
Malte pilsen**Malte trigo****Malte caramelo****Malte chocolate**

Figura 22 – Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis nos maltes especiais 2º lote.

A análise dos gráficos da Figura 22 permitiram verificar que existem algumas diferenças relativamente ao 1º lote.

No malte *pilsen* os compostos predominantes foram os aldeídos, hidrocarbonetos e álcoois com teores de 31%, 20% e 15%, respetivamente. Comparativamente ao malte *pilsen* do 1º lote verificou-se que no 2º lote há uma diminuição de álcoois e um aumento de hidrocarbonetos. Nesta mesma amostra (malte *pilsen* 2º lote) verifica-se um aumento do DMS e dos derivados do DMS (13% e 14%, respetivamente), o que difere do 1º lote, pois o DMS e os derivados do DMS na amostra de *pilsen* do 1º lote encontram-se num teor de 3% e 0%, respetivamente. Os restantes compostos (cetonas, ácidos carboxílicos, esterres, compostos furânicos, decanos e outros) desta amostra do segundo lote variam entre 1% e 2%.

No malte de trigo não existem grandes diferenças relativamente ao 1º lote nas proporções dos compostos químicos predominantes. No malte de trigo do 2º lote os compostos predominantes foram os álcoois, aldeídos e hidrocarbonetos com teores de 54%, 20% e 10%, respetivamente. Comparativamente ao malte de trigo do 1º lote, estes 3 grupos químicos também eram os que estavam em maior proporção, no entanto, verifica-se que no 2º lote há um aumento do teor dos álcoois e uma diminuição do teor dos hidrocarbonetos. Os restantes compostos (cetonas, ácidos carboxílicos, esterres, compostos furânicos, decanos, pirazinas, DMS e derivados do DMS) variaram entre 1% e 5%.

No malte caramelo, os compostos que se destacaram foram os compostos furânicos, cetonas e aldeídos com teores de 33%, 29% e 26%, respetivamente. Comparativamente ao malte caramelo do 1º lote, não existem grandes diferenças, pois os compostos predominantes foram os mesmos, no entanto, verifica-se um aumento do teor de cetonas que no 1º lote está com uma percentagem de 19% e no 2º lote com 29%. Os restantes compostos (álcoois, ácidos carboxílicos, esterres, hidrocarbonetos, decanos, pirazinas, compostos fenólicos, DMS e outros) variaram entre 1% e 3%.

No malte chocolate, verificou-se um perfil de compostos voláteis diferente quando comparado com os restantes maltes do mesmo lote e do lote anterior. Os compostos que se encontraram maioritariamente no malte chocolate do 2º lote foram as pirazinas, compostos furânicos e hidrocarbonetos com percentagens de 31%, 28% e 12%, respetivamente. Relativamente à mesma amostra de malte do 1º lote, verifica-se um aumento das pirazinas e hidrocarbonetos e uma diminuição acentuada dos aldeídos (22% para 2%). Os restantes compostos desta amostra de malte (cetonas, álcoois, ácidos carboxílicos, esterres, decanos, pirazinas, piridinas, aminas, amidas, DMS, compostos fenólicos e outros) variaram entre 1% a 10%.

Nos quatro tipos de malte do 2º lote verificou-se, o mesmo que se verificou para o 1º lote, ou seja, um maior número de álcoois, no malte *pilsen* e trigo relativamente ao malte caramelo e chocolate e um maior número de compostos furânicos no malte caramelo e chocolate relativamente ao malte *pilsen* e de trigo. O que se justifica pelo facto de estes dois últimos maltes especiais sofrerem um tipo de torrefação diferente, com temperaturas mais elevadas, relativamente aos dois primeiros maltes.

Os maltes especiais escuros podem ser definidos como maltes sujeitos a altas temperaturas de torra, sendo esta mais elevada, quando comparado com o malte *pilsen*, e o malte torrado, entre outros. Dependendo do processo de produção, estes maltes podem ser, geralmente classificados em três grupos de malte: malte de cor, malte caramelo e malte torrado (Coghe *et al.*, 2005)

Segundo Fors & Eriksson (1986) e De Schutter *et al.* (2008) os maltes sujeitos a um processamento com temperatura mais elevada são mais ricos em pirazinas (Fors & Eriksson, 1986; De Schutter *et al.*, 2008), o mesmo verificou-se no presente trabalho, pois o malte chocolate contém um maior número de pirazinas, quando comparado com os restantes maltes.

Coghe *et al.* (2004) na análise sensorial e instrumental do “*flavour*” do mosto da cerveja com maltes escuros constatou que o DMS estava associado ao malte *pilsen*, mas que rapidamente foi mascarado pela adição do malte escuro (Coghe *et al.*, 2004). De acordo com os resultados do 1º e 2º lote, verifica-se que o DMS no malte *pilsen* é cerca de 3% e 13% da fração volátil, respetivamente, enquanto no malte chocolate este composto não foi detetado.

Vandecan *et al.* (2010) avaliaram a concentração dos compostos do *flavour* de 3 tipos de maltes especiais, o malte de cor, o malte caramelo e o malte torrado e verificaram que no malte torrado os compostos predominantes foram as pirazinas, isto porque a temperatura de torrefação deste malte rondavam os 250°C não sendo surpresa a presença destes compostos no malte torrado. Os restantes maltes sofreram uma torrefação menos elevada quando comparado com o malte torrado, e por este motivo, os compostos furânicos formados foram o norfuraneol e furaneol, sendo estes intermediários das reações de *Maillard*. As cetonas β -Damascenone e γ -nonalactone foram encontradas em altas concentrações no malte de cor e os aldeídos foram encontrados em grandes quantidades no malte caramelo (Vandecan *et al.*, 2010). De acordo com os resultados dos 2 lotes de maltes especiais, verifica-se concordância com este autor no malte chocolate e no malte caramelo. No malte chocolate (malte sujeito a elevada temperatura de torra), verifica-se que as pirazinas se encontram em grandes quantidades, tanto no 1º

como no 2º lote, com teores de 17% e 31%, respetivamente. Relativamente ao malte caramelo, verifica-se a que os aldeídos também se encontram em grandes quantidades tanto no 1º como no 2º lote com percentagens de 33% e 26%, respetivamente.

Yahya *et al.* (2014) determinaram a composição do *flavour* de 1 tipo de cevada, cevada torrada e 2 maltes especiais, o malte cristal e o malte preto. Os autores verificaram que o malte cristal continha uma vasta gama de compostos voláteis, quando comparado com a cevada torrada que continha poucos compostos voláteis. Verificaram também, em termos de *flavour*, que o malte cristal continha uma maior quantidade de maltol e de 2-metilpirazina quando comparados com o malte preto e cevada torrada (Yahya *et al.*, 2014). De acordo com o nosso trabalho, verifica-se que o malte chocolate (malte torrado) tem uma maior quantidade de pirazinas quando comparado com o malte caramelo, tanto no 1º como no 2º lote. Os resultados deste autor podem ser justificados pelos baixos níveis de humidade e a elevada temperatura de torrefação do malte cristal e que provocaram um aumento dos níveis de metilpirazina, furfural, pirrol, 5-metil-2-furfural, benzenoacetaldeído e maltol (Yahya *et al.*, 2014).

Os resultados da análise do perfil de voláteis nos diferentes tipos de malte revelaram que somente no malte *pilsen* o DMS contribuiu com uma percentagem superior a 3% para o total da fração volátil.

3.3 Malte *pilsen* proveniente da minimaltaria

3.3.1 Perfil de voláteis

Duas variedades de cevada (*Quench* e *Tipple*) foram sujeitas a um processo de maltagem denominado de minimaltaria. Deste processo resultaram alguns lotes e destes foram analisados os lotes denominados por: A, B, C, D, E, F, em que as suas características encontram-se referidas em 2.1.

As áreas dos compostos voláteis obtidos através da análise em HS-SPME GC-MS foram agrupadas em famílias químicas (aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, compostos furânicos, hidrocarbonetos, DMS, derivados do DMS e outros). Os resultados resumem-se nas Figuras 23-29.

3.3.1.1 Variedade *Quench*

Os lotes A e B (Figuras 23 e 24) correspondem à variedade de cevada *Quench*, com temperaturas diferentes. O lote A tem uma temperatura de estufagem de 75°C e o lote B tem uma temperatura de estufagem de 85°C.

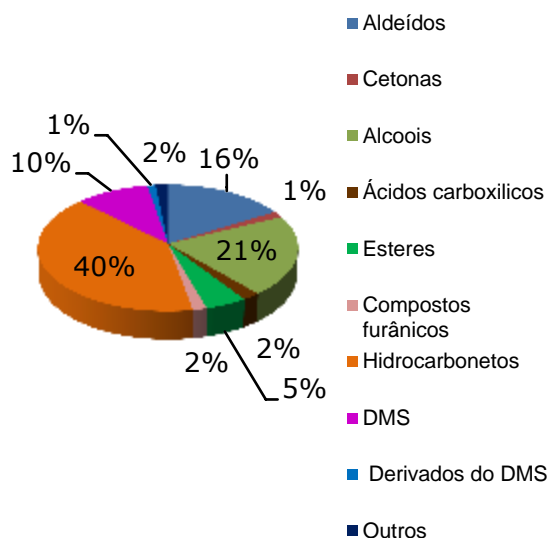
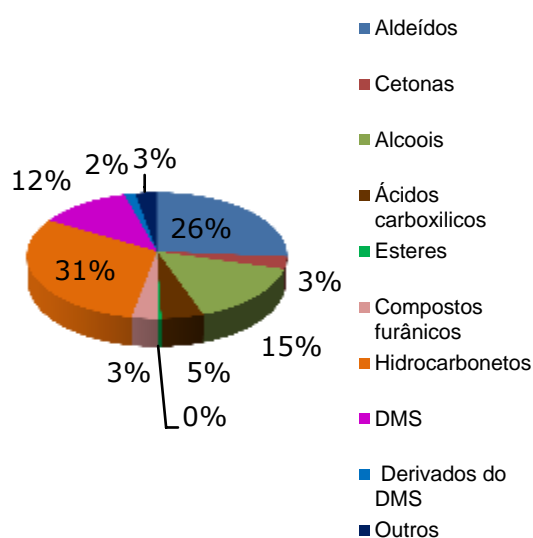
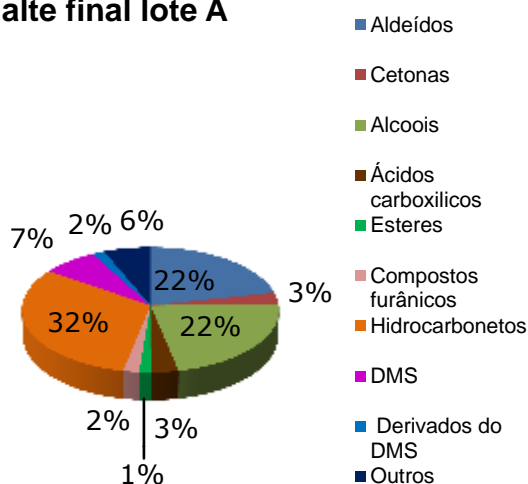
Estufagem início lote A**Estufagem final lote A****Malte final lote A**

Figura 23 – Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote A.

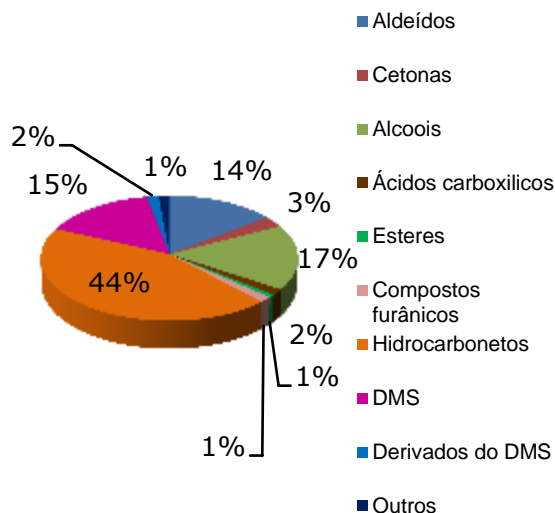
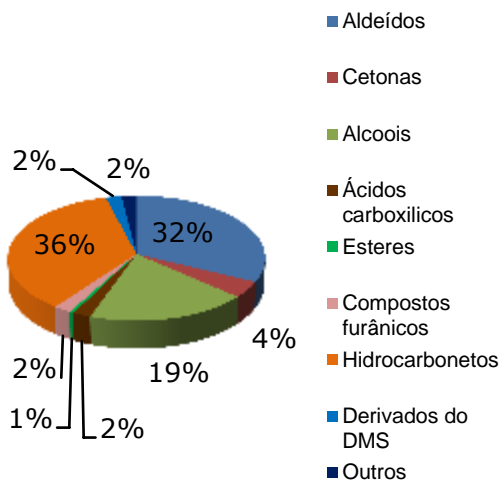
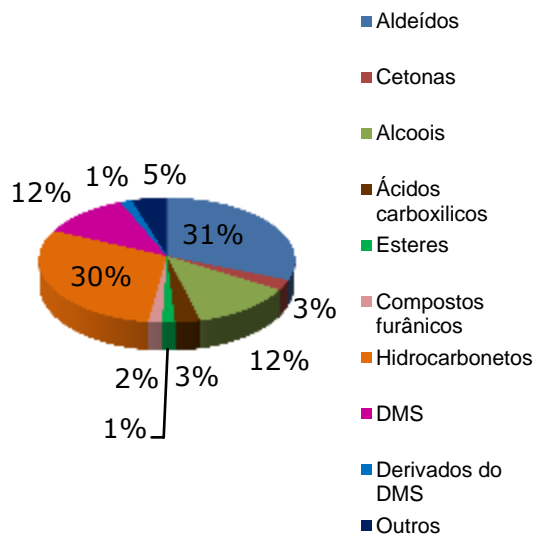
Estufagem início lote B**Estufagem fim lote B****Malte final lote B**

Figura 24 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote B.

A análise dos gráficos dos lotes A e B no início e no fim da estufagem e no malte final revelou que os compostos predominantes eram os hidrocarbonetos, com percentagens compreendidas entre 44 e 30%, seguindo-se os aldeídos com percentagens compreendidas entre 32 e 14% e por fim, os álcoois com teores compreendidos entre 22 e 12%. O pico do DMS corresponde a 7% e 12% do total da área dos compostos voláteis, respetivamente nos lotes A e B.

Verifica-se que do lote A para o lote B há, na generalidade, um aumento do teor de aldeídos e uma diminuição do teor de álcoois, isto poderá ter a ver com o aumento da temperatura do lote A para o B (75° e 85°C, respetivamente).

3.3.1.2 Variedade *Tipple*

Os restantes lotes C, D, E, F e G das Figuras (25-29) pertencem à variedade *Tipple* e sofreram estufagem a diferentes temperaturas. Os lotes C e D foram submetidos a uma temperatura de estufagem de 85°C e os lotes E, F e G a uma temperatura de estufagem de 75°C.

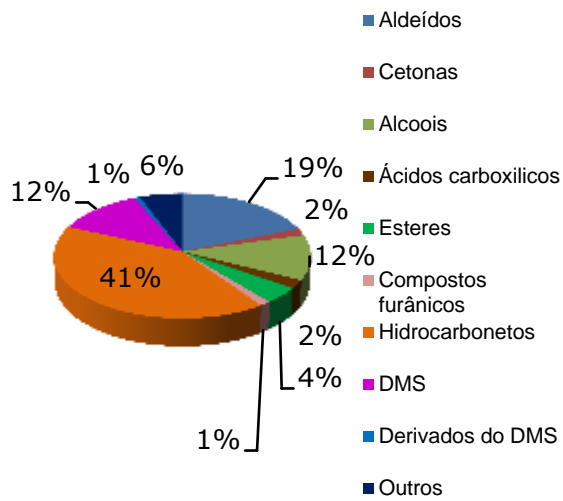
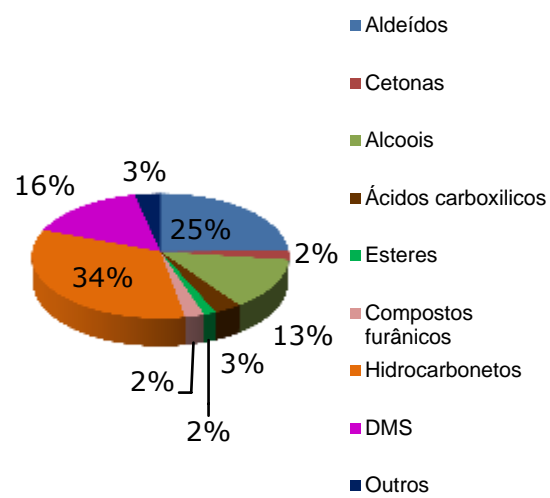
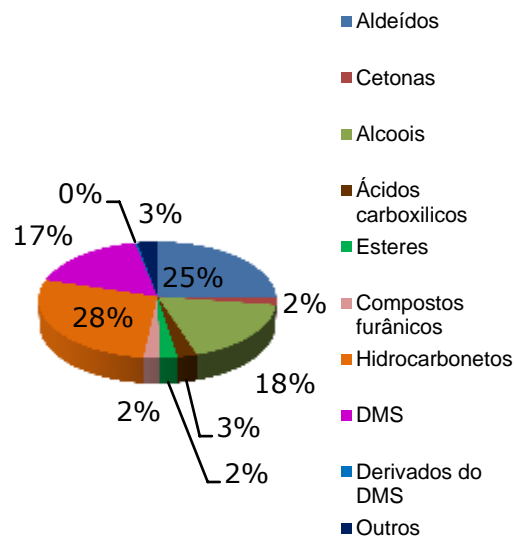
Estufagem inicio lote C**Estufagem final lote C****Malte final lote C**

Figura 25 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote C.

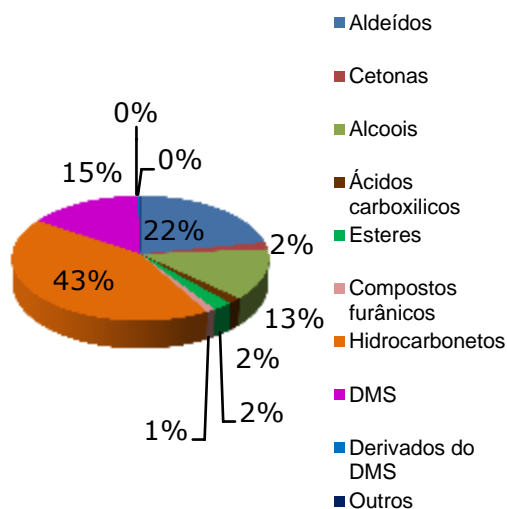
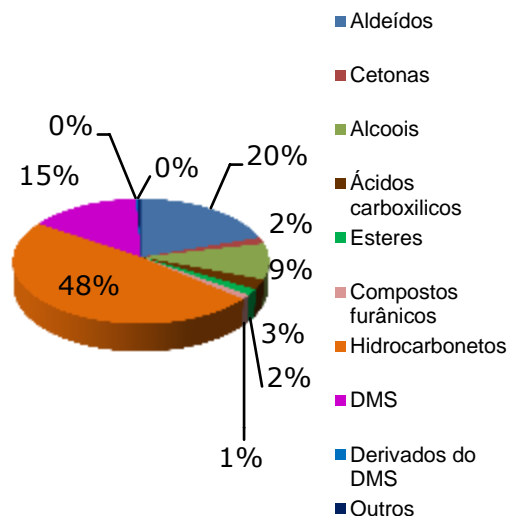
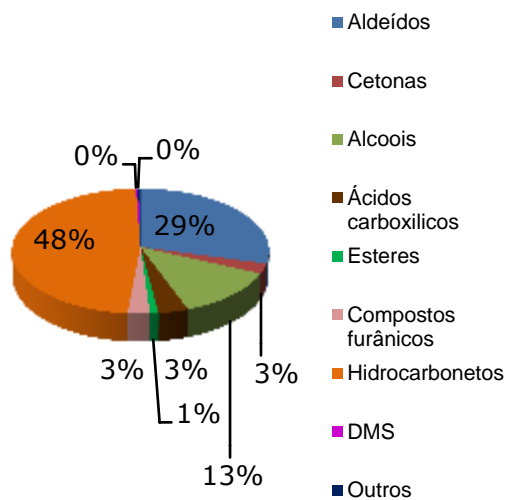
Estufagem início lote D**Estufagem final lote D****Malte final lote D**

Figura 26 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote D.

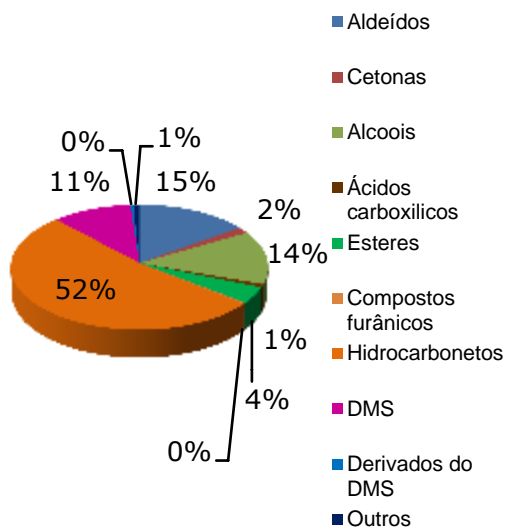
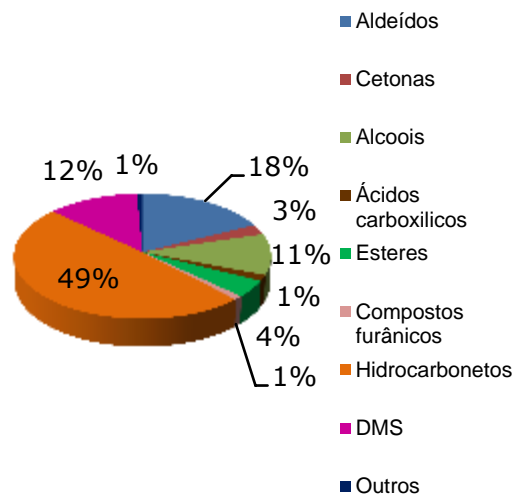
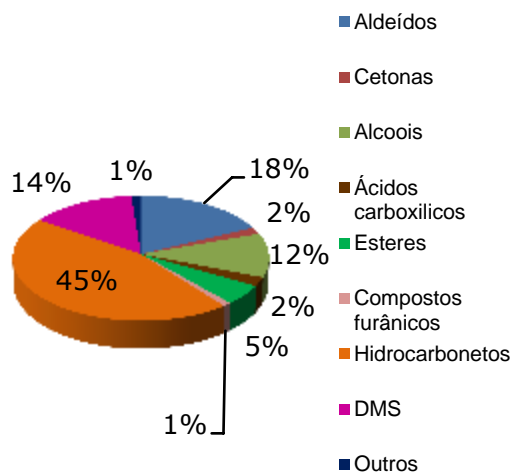
Estufagem inicio lote E**Estufagem fim lote E****Malte final lote E**

Figura 27 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote E.

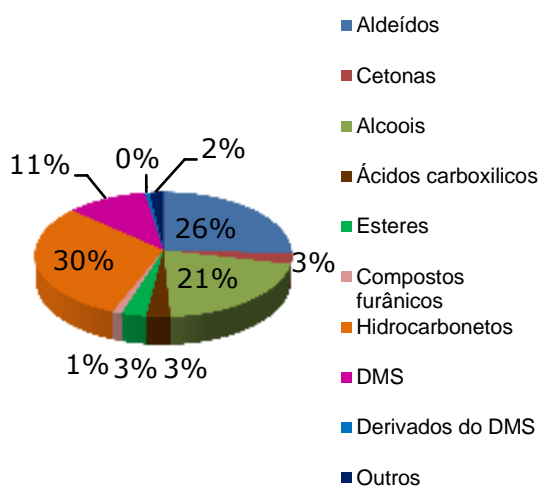
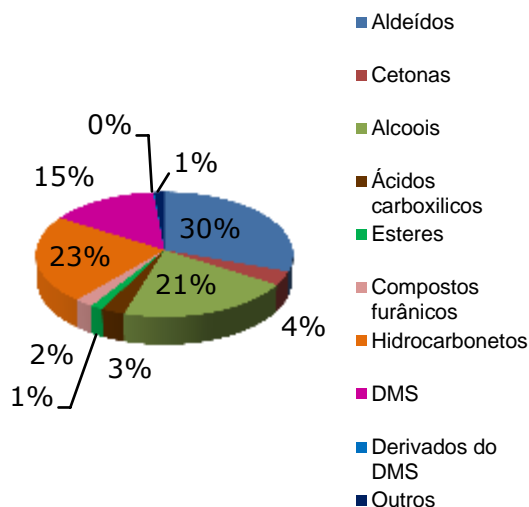
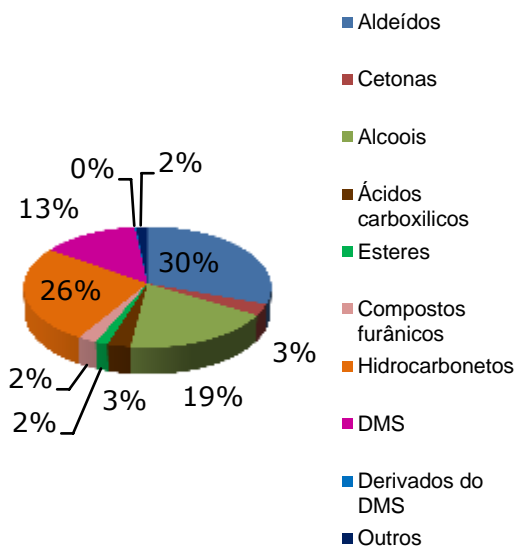
Estufagem início lote F**Estufagem fim lote F****Malte final lote F**

Figura 28 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote F.

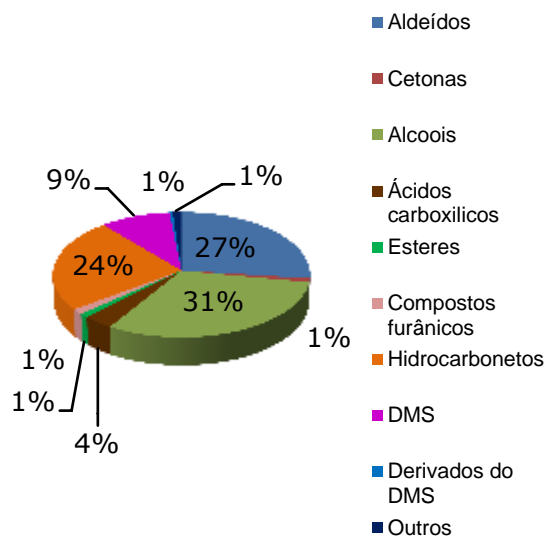
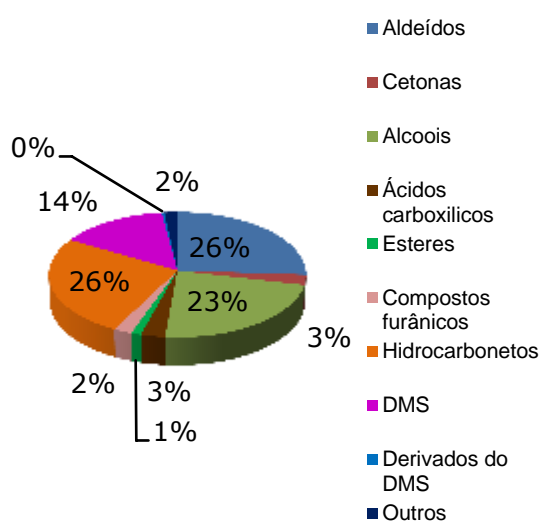
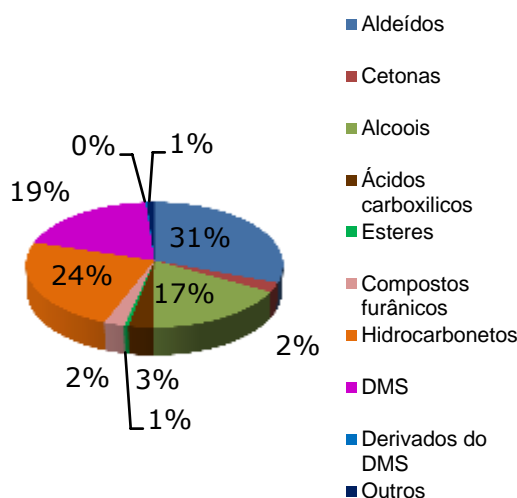
Estufagem inicio lote G**Estufagem fim lote G****Malte final lote G**

Figura 29 - Representação gráfica dos resultados do perfil de voláteis dos maltes no início e fim da estufagem e do malte final do lote G.

Os lotes C e D que tiveram uma temperatura de estufagem de 85°C continham maiores quantidades de hidrocarbonetos, com teores compreendidos entre 48 e 28%, de aldeídos, com percentagens compreendidas entre 29-19% e de álcoois, com teores compreendidos entre 18 e 9%.

Nos lotes E, F e G, que tiveram uma temperatura de estufagem de 75°C, também se observou que a maior percentagem de área correspondia aos hidrocarbonetos, com teores compreendidos entre 52 e 23%, seguindo-se os aldeídos, com percentagens compreendidas entre 31 e 15% e os álcoois com percentagens entre 31 e 11%. O perfil de voláteis dos maltes F e G foi muito semelhante, estes maltes apresentaram algumas diferenças quantitativas relativamente ao malte E que foi produzido em condições semelhantes.

Nos primeiros dois lotes (A e B) da variedade *Quench*, chegou-se à conclusão que com uma maior temperatura de estufagem (85°C) havia uma maior formação de aldeídos e uma menor formação de álcoois. Nos restantes lotes (C e D com temperatura de estufagem de 85°C e E, F, G e H com temperatura de estufagem de 75°C) da variedade *Tipple*, não se verificou o mesmo, pois na generalidade, tanto os aldeídos como os álcoois encontravam-se em maiores quantidades com a temperatura de estufagem de 75°C. Provavelmente, a variedade (*Quench* ou *Tipple*) também poderá influenciar a formação de aldeídos e álcoois e o efeito não resultar só da temperatura de estufagem.

Verificou-se também que no malte *pilsen* proveniente das duas variedades de cevada (*Quench* e *Tipple*) há, na generalidade, uma grande percentagem de DMS com teores compreendidos entre 7 e 19%, isto pode ser justificado pelas baixas temperaturas de estufagem (75° e 85°C) usadas no processo de produção deste malte.

De acordo com a literatura, os compostos voláteis responsáveis pelo aroma final da cerveja são os álcoois, ésteres e grupos carbonilo como os aldeídos, cetonas e compostos sulfurados (Kobayashi *et al.*, 2008). Os compostos que contêm o grupo carbonilo têm atraído especial atenção, pois são conhecidos por causar alterações de sabor em diversos produtos alimentares (Vanderhaegen *et al.*, 2006).

Os compostos voláteis maioritariamente identificados por Cramer *et al.* (2005), na cevada e no trigo foram aldeídos, cetonas, álcoois e compostos furânicos. Segundo estes autores, os álcoois eram os principais constituintes qualitativos da cevada, seguindo-se os aldeídos, as cetonas e os compostos furânicos (Cramer *et al.*, 2005). Dong *et al.* (2013) identificaram um total de 47 compostos voláteis durante todo o processo de maltagem agrupando-os em aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos orgânicos, compostos furânicos e DMS (Dong *et al.*, 2013). Se compararmos com o perfil de voláteis observado no trabalho, também foi possível identificar no início e fim da estufagem e no malte final das variedades *Quench* e *Tipple* os mesmos grupos de compostos químicos reportados pelos autores. Nos 7 lotes analisados, nem sempre se verificou uma maior quantidade de álcoois como referido por Cramer *et al.* (2005), comparativamente aos aldeídos. Nos lotes

A e B os álcoois obtiveram uma maior quantidade, em termos de percentagens, quando comparados com os aldeídos. Nos restantes lotes (C, D, E, F, G) o mesmo não se verificou, exceto para a estufagem início do lote G, pois os aldeídos nestes lotes obtiveram teores superiores aos álcoois. As cetonas e os compostos furânicos tanto na variedade *Quench* como na variedade *Tipple* aparecem em pequenas quantidades.

3.3.2 Análise estatística do perfil de voláteis do malte *pilsen* proveniente da minimaltaria

Avaliar a evolução da fração volátil do malte a ao longo da estufagem a diferentes temperaturas utilizando a percentagem relativa de cada grupo químico dá uma informação muito geral. Com o intuito de conhecer com mais detalhe as modificações que ocorrem nos voláteis que têm uma marcada influência no *flavour*, efetuou-se uma análise ANOVA TWO-WAY utilizando como variáveis as áreas dos picos dos aldeídos, cetonas e álcoois. Esta análise estatística foi feita separadamente para as duas variedades (*Quench* e *Tipple*) de modo a ser possível comparar o efeito do processo de estufagem e o efeito da temperatura. Esta análise permitiu ver se havia diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) nos aldeídos, cetonas e álcoois identificados ao longo do processo de estufagem que foi realizado a duas temperaturas diferentes, nas 2 variedades analisadas. Inicialmente fez-se a comparação entre os dois lotes da variedade *Quench* (lotes A e B) e posteriormente, fez-se a mesma análise para a variedade *Tipple* (lotes C, D, E, F e G)

3.3.2.1 Variedade *Quench*

A Tabela 10 e a Figura 30 resumem os resultados da ANOVA TWO-WAY para avaliar o efeito da temperatura e do processo de estufagem na composição em aldeídos do malte da variedade *Quench*.

Tabela 10 - Resultados da ANOVA TWO-WAY para avaliar o efeito da temperatura e do processo de estufagem nos aldeídos do malte da variedade *Quench*.

Compostos	Efeito da temperatura		Efeito do processo de estufagem	
	F	p	F	p
2-Metilpropanal	2,353	0,176	1,937	0,224
n-Butanal	0,288	0,611	1,574	0,282
3-Metilbutanal	18,195	0,005	18,805	0,003
2-Metilbutanal	3,704	0,103	6,967	0,027
n-Pentanal	1,819	0,226	1,769	0,249
(E)-2-Pentenal	0,232	0,647	0,119	0,890
n-Hexanal	0,159	0,704	0,377	0,701
(E)-2-Hexenal	0,554	0,485	0,351	0,718
n-Heptanal	2,096	0,198	1,047	0,407
3-(Metiltio)propanal	24,211	0,003	17,480	0,003
2-Heptenal	0,120	0,741	4,298	0,069
Benzaldeído	0,104	0,758	11,476	0,009
n-Octanal	0,444	0,530	1,951	0,222
Benzenaacetaldeído	0,787	0,409	0,199	0,825
n-Nonanal	0,236	0,644	1,199	0,365
(E)-2-Nonenal	0,059	0,816	0,908	0,452
Decanal	2,330	0,178	2,283	0,183
3,5-Dimetilbenzaldeído	8,306	0,028	4,801	0,057

De acordo com a Tabela 10 verificou-se que no geral não houve diferenças estatisticamente significativas para a maior parte dos aldeídos. No entanto, no efeito da temperatura, foi significativo para o 3-Metilbutanal, 3-(Metiltio)propanal e o 3,5-Dimetilbenzaldeído. No efeito do processo de estufagem verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para os compostos 3-Metilbutanal, 2-Metilbutanal, 3-(Metiltio)propanal e o Benzaldeído.

A Figura 30 representa os gráficos dos compostos 3-Methylbutanal, 2-Methylbutanal, Benzaldeído, 3-(Metiltio)propanal e 3,5-Dimetilbenzaldeído com diferenças estatisticamente significativas no efeito da temperatura e/ou no efeito do processo de estufagem.

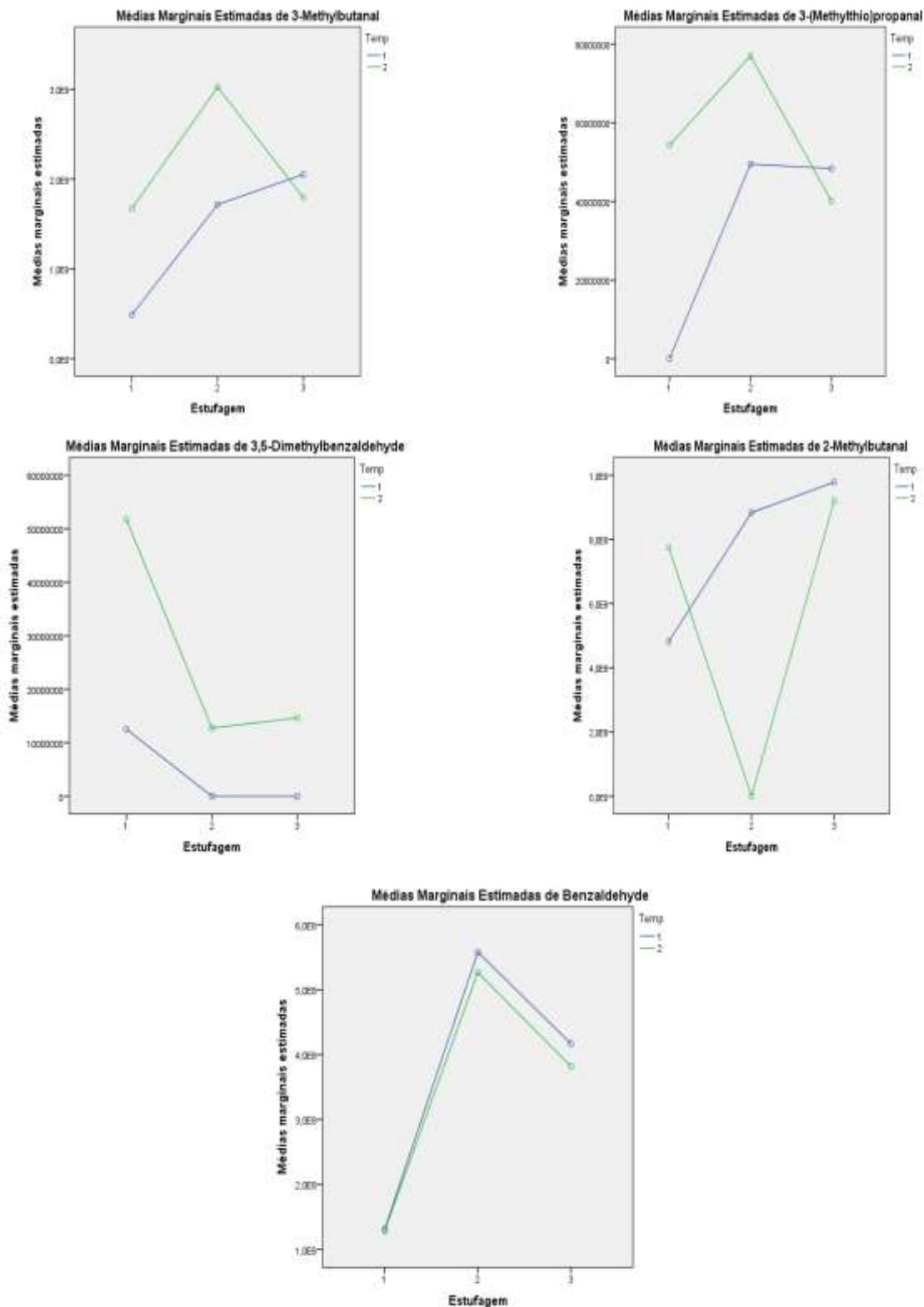


Figura 30 - Aldeídos - 3-Metilbutanal, 3-(Metiltio)propanal e o 3,5-Dimetilbenzaldeído com diferenças estatisticamente significativas no efeito da temperatura e 3-Metilbutanal, 2-Metilbutanal, Benzaldeído, 3-(Metiltio)propanal e 3,5-Dimetilbenzaldeído com diferenças estatisticamente significativas no processo de estufagem. A linha 1 representa a temperatura de 75°C e a linha 2 representa a temperatura de 85°C. Os pontos 1, 2 e 3 representam a estufagem início, fim e malte final, respetivamente.

Nos gráficos da Figura 30 observa-se maior proporção de aldeídos no malte que foi submetido à temperatura de estufagem de 85°C em comparação com o malte que teve a temperatura de estufagem de 75°C. Verificou-se, em termos de áreas que os aldeídos que obtiveram diferenças estatisticamente significativas, ou seja, o 3-Metilbutanal, 3-(Metiltio)propanal e o 3,5-Dimetilbenzaldeído no parâmetro efeito da temperatura obtiveram, uma maior área para a estufagem a 85°C. O mesmo foi observado para o grupo químico dos aldeídos no perfil dos voláteis, pois com a temperatura de estufagem de 85°C havia, em termos de percentagem, um maior proporção de aldeídos quando comparado com a estufagem de 75°C. Podemos então afirmar, que na variedade *Quench* a temperatura influencia a formação dos aldeídos

Tendo em conta o parâmetro efeito do processo de estufagem, verifica-se, na generalidade, que da estufagem inicial para a estufagem fim há um aumento quantitativo em termos de áreas e no malte final há um decréscimo. O mesmo não se verifica com o composto 3-metilbutanal na temperatura de estufagem de 75°C, pois este é crescente ao longo das estufagens (início, fim e malte final) não havendo decréscimo em nenhuma das mesmas. O mesmo foi verificado na análise do perfil de voláteis expresso em percentagem, pois a proporção dos aldeídos, em termos de percentagens, aumenta da estufagem início para a estufagem fim e diminui no malte final. Podemos então concluir que a estufagem na variedade *Quench* influenciou a quantidade de aldeídos, a quantidade máxima ocorreu no final da estufagem.

Posteriormente realizou-se a ANOVA TWO-WAY para o efeito da temperatura e do processo de estufagem para o grupo químico Cetonas no malte da variedade *Quench*. Os resultados apresentam-se na Tabela 11 e na Figura 31.

Tabela 11 - Resultados da ANOVA TWO-WAY para avaliar o efeito da temperatura e do processo de estufagem nas cetonas do malte da variedade *Quench*.

Compostos	Efeito da temperatura		Efeito do processo de estufagem	
	F	p	F	p
Acetona	2,033	0,192	0,729	0,512
3-Metil-2-butanona	0,007	0,933	0,449	0,654
2,3-Butanediona	0,415	0,537	1,413	0,298
2-Butanona	0,083	0,781	3,455	0,083
2-Pentanona	0,547	0,481	1,776	0,230
3-Hidroxi-2-butanona	0,317	0,589	0,564	0,590
2-Heptanona	0,246	0,633	1,970	0,202
6-Metil-5-hepten-2-ona	0,370	0,560	0,235	0,796
2-Octanona	2,896	0,127	4,821	0,042
3,5-Octadien-2-ona	1,21	0,736	0,345	0,718

A análise da Tabela 11 mostra que não houve diferenças estatisticamente significativas para as cetonas da variedade *Quench* relativamente ao efeito da temperatura e no processo de estufagem nas cetonas. Somente se verificaram diferenças estatisticamente significativas para a 2-octanona no processo de estufagem.

A Figura 31 apresenta a evolução do composto 2-octanona que mostrou diferenças estatisticamente significativas para o efeito do processo de estufagem.

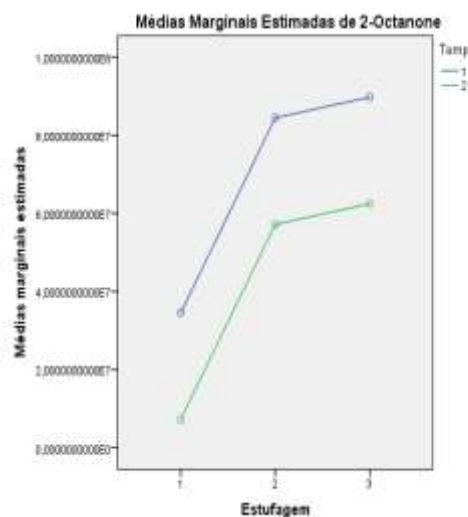


Figura 31 – Cetona - 2-Octanona com diferença estatisticamente significativa no processo de estufagem em que a linha 1 representa a temperatura de 75°C e a linha 2 representa a temperatura de 85°C. Os pontos 1, 2 e 3 representam a estufagem início, fim e malte final, respetivamente.

Através da análise do gráfico, verificou-se que a 2-Octanona tende a aumentar, significativamente o seu teor da estufagem início para a estufagem fim e aumenta ligeiramente da estufagem fim para o malte final, tanto com a temperatura de 75°C como com a temperatura de 85°C. No perfil de voláteis do lote A foi possível observar que havia um aumento das cetonas da estufagem início para a estufagem fim mantendo-se a mesma percentagem para o malte final. Não é possível chegar a uma conclusão fidedigna acerca das cetonas devido à sua baixa percentagem e a quase inexistência de diferenças estatisticamente significativas.

Por fim, seguiu-se a análise ANOVA TWO-WAY relativamente ao efeito da temperatura e ao processo de estufagem da variedade *Quench* para o grupo químico Álcoois. Os resultados apresentam-se na Tabela 12 e na Figura 32.

Tabela 12 - Resultados da ANOVA TWO-WAY para avaliar o efeito da temperatura e do processo de estufagem nos álcoois do malte da variedade *Quench*.

Compostos	Efeito da temperatura		Efeito do processo de estufagem	
	F	p	F	p
Etanol	0,069	0,799	0,313	0,740
2-Metil-1-propanol	2,615	0,145	2,195	0,174
1-Butanol	2,386	0,161	3,831	0,068
1-Penten-3-ol	2,204	0,176	0,300	0,749
3-Metil-1-butanol	4,828	0,059	0,554	0,595
2-Metil-1-butanol	3,521	0,097	1,574	0,265
1-Pentanol	0,231	0,643	3,040	0,104
2,3-Butanediol	2,988	0,122	3,774	0,070
1-Hexanol	0,589	0,465	0,028	0,972
1-Heptanol	10,017	0,013	1,427	0,295
1-Octen-3-ol	1,157	0,313	0,179	0,839
2-Etil-1-hexanol	1,187	0,308	9,747	0,007
Benzenoetanol	1,833	0,213	0,524	0,611
1-Nonanol	9,133	0,017	2,148	0,179
2-(2-Butoxi)etanol	7,140	0,028	2,376	0,155
1-Octanol	1,452	0,263	0,926	0,435

Os resultados da Tabela 12 mostram que no geral não se verificaram diferenças estatisticamente significativas para a maior parte dos álcoois. No entanto, para o efeito da temperatura, houve diferenças estatisticamente significativas para os compostos 1-Heptanol, 1-Nonanol e para o 2-(2-Butoxi)etanol e para o efeito do processo de estufagem, apenas houve diferença estatística para o 2-Etil-1-hexanol.

A Figura 32 mostra a evolução dos compostos 1-Heptanol, 1-Nonanol, 2-(2-Butoxi)etanol e 2-Etil-1-hexanol que apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o efeito da temperatura e/ou para o efeito do processo de estufagem.

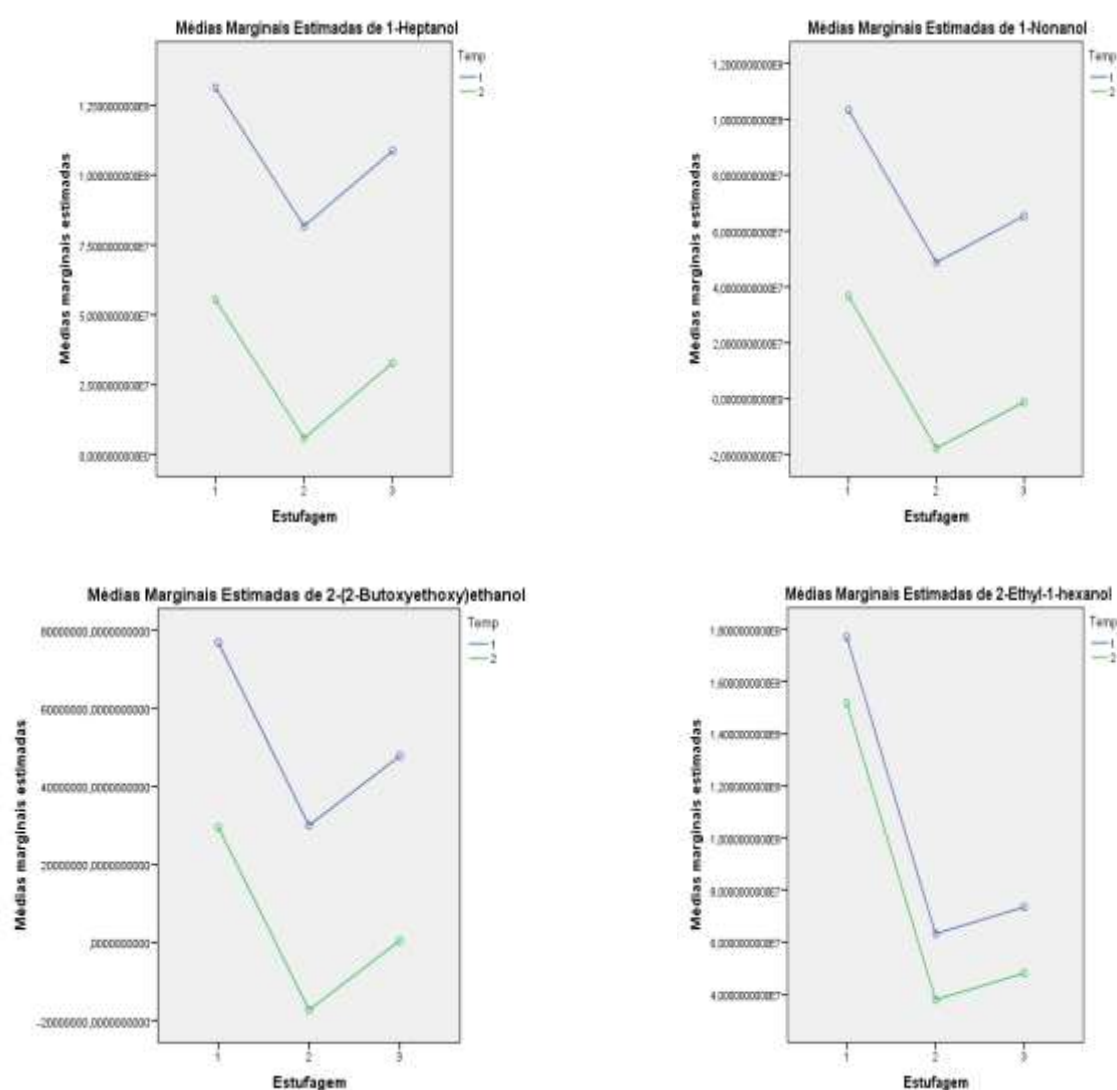


Figura 32 – Álcoois - 1-Heptanol, 1-nonanol e 2-(2-Butoxi)etanol e 2-Etil-1-hexanol com diferença estatisticamente significativa no efeito da temperatura e 2-Etil-1-hexanol com diferença estatisticamente significativa no efeito do processo de estufagem em que a linha 1 representa a temperatura de 75°C e a linha 2 representa a temperatura de 85°C. Os pontos 1, 2 e 3 representam a estufagem início, fim e malte final, respectivamente.

No que respeita ao efeito da temperatura de estufagem na variedade *Quench* verificou-se uma diminuição da quantidade de álcoois com o aumento da temperatura de estufagem, ou seja, verifica-se que a área dos compostos 1-Heptanol, 1-Nonanol e 2-(2-Butoxi)etanol diminui à medida que aumenta a temperatura de estufagem de 75°C para 85°C. O mesmo já tinha sido verificado na percentagem dos álcoois no perfil de voláteis. Em termos do efeito do processo de estufagem verifica-se que há uma diminuição do composto 2-Ethyl-1-hexanol da estufagem início para a estufagem fim e um ligeiro aumento no malte final. Pode-se então concluir, que na generalidade, que há uma diminuição da proporção dos álcoois à medida que aumenta a temperatura de estufagem (75°C para 85°C) e uma diminuição acentuada entre a estufagem início e estufagem fim com um ligeiro aumento no malte final.

No que respeita aos compostos voláteis responsáveis pelo *flavour* na variedade *Quench*, verificou-se um aumento da proporção de aldeídos à medida que aumenta a temperatura de estufagem de 75°C para 85°C e uma diminuição da formação de álcoois para o mesmo aumento de temperatura.

3.3.2.2 Variedade *Tipple*

Efetou-se uma ANOVA TWO-WAY para avaliar o do processo de estufagem e o efeito da temperatura de estufagem nos aldeídos, cetonas e álcoois identificados nos lotes de malte *pilsen* da *Tipple*. São desta variedade os lotes C, D, E, F e G. Os lotes C e D sofreram uma estufagem de 85°C e os lotes E, F e G sofreram uma estufagem de 75°C. A ANOVA TWO-WAY foi realizada utilizando as áreas dos compostos identificados nos lotes C e D que foram submetidos a estufagem a 85°C e utilizando as áreas dos lotes E, F e G que foram submetidos a estufagem a 75°C. A Tabela 13 apresenta os resultados do efeito da temperatura e do efeito do processo de estufagem nos aldeídos que foram identificados no malte da variedade *Tipple*.

Tabela 13 - Resultados da ANOVA TWO-WAY para avaliar o efeito da temperatura e do processo de estufagem nos aldeídos da variedade *Tipple*.

Compostos	Efeito da temperatura		Efeito do processo de estufagem	
	F	p	F	p
2-Metilpropanal	0,656	0,426	1,767	0,192
n-Butanal	3,834	0,062	2,477	0,105
3-Metilbutanal	3,481	0,074	4,984	0,015
2-Metilbutanal	3,617	0,069	3,335	0,053
n-Pentanal	0,165	0,688	1,440	0,257
(E)-2-Pentenal	0,585	0,452	0,638	0,537
n-Hexanal	0,035	0,853	3,120	0,062
(E)-2-hexenal	3,033	0,094	2,977	0,070
n-Heptanal	6,065	0,021	0,269	0,766
3-(Metiltio)propanal	1,874	0,184	28,822	0,000
2-Heptenal	2,938	0,099	1,551	0,233
Benzaldeído	0,379	0,544	2,505	0,103
n-Octanal	6,139	0,021	0,213	0,810
Benzeneacetaldéido	0,226	0,638	2,704	0,087
n-Nonanal	3,095	0,091	1,388	0,269
(E)-2-Nonenal	3,837	0,062	3,713	0,039
Decanal	8,026	0,009	0,205	0,816
Acetaldeído	0,009	0,926	0,760	0,479
Iso butiraldeído	1,551	0,225	2,514	0,102
(E)-2-heptenal	0,037	0,849	0,129	0,879
2-Octenal	2,816	0,106	3,201	0,059

Na Tabela 13 observa-se que para a variedade *Tipple* a maior parte dos aldeídos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, embora, para o efeito da temperatura o n-Heptanal, o n-Octanal e o Decanal obtivessem diferenças estatisticamente significativas e para o efeito do processo de estufagem o 3-Metilbutanal, 3-(Metiltio)propanal e o (E)-2-Nonenal também obtivessem diferenças estatisticamente significativas.

A Figura 33 mostra a evolução dos compostos n-Octanal, n-Heptanal, Decanal, 3-Metilbutanal, 3-(Metiltio)propanal e o (E)-2-Nonenal que apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o efeito da temperatura e/ou o efeito do processo de estufagem.

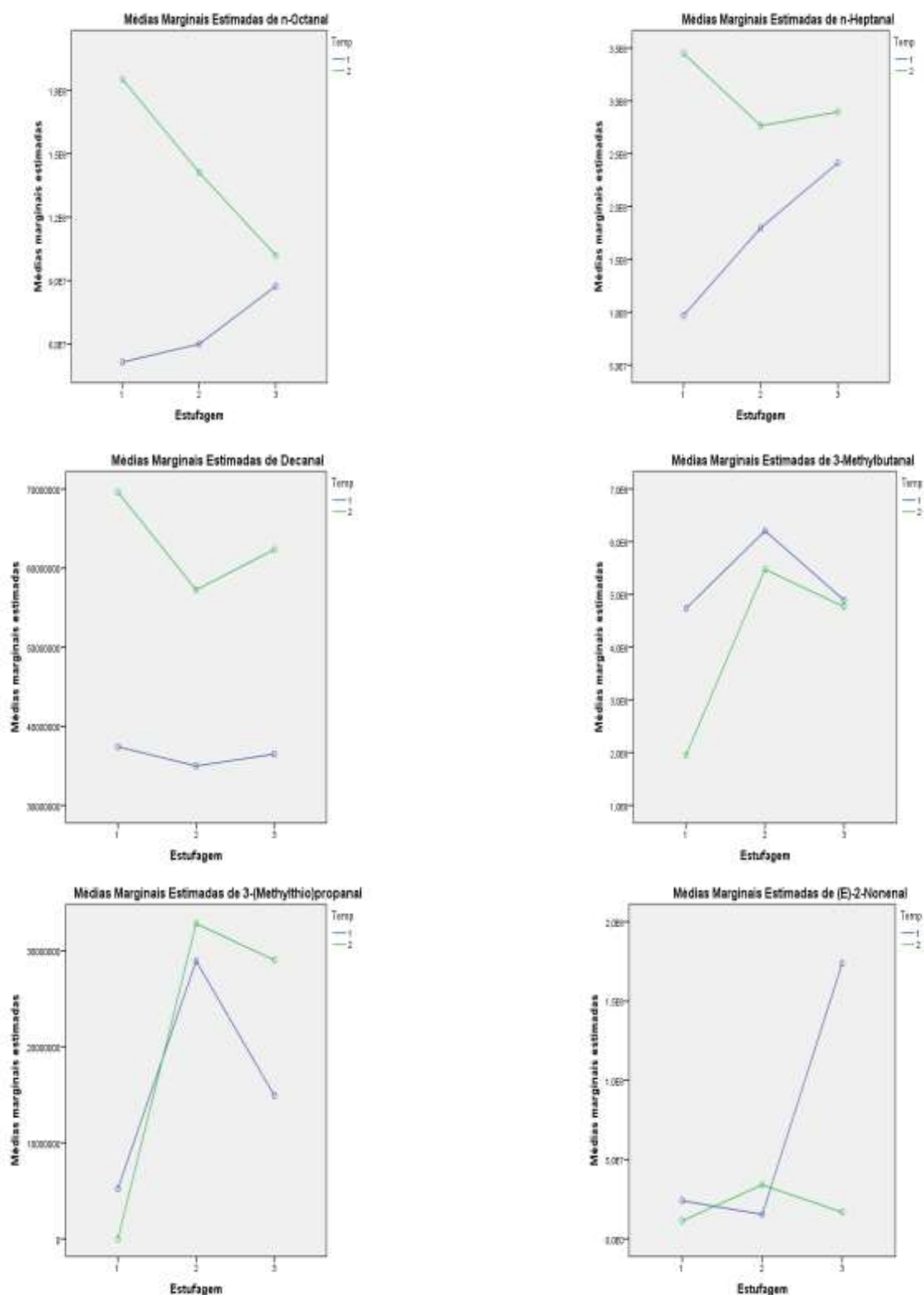


Figura 33 - Aldeídos - n-Octanal, n-Heptanal, Decanal, 3-Metilbutanal, 3-(Metiltio)propanal e o (E)-2-Nonenal com diferença estatisticamente significativa no efeito da temperatura e 2-Etil-1-hexanol com diferença estatisticamente significativa no efeito do processo de estufagem em que a linha 1 representa a temperatura de 85°C e a linha 2 representa a temperatura de 75°C. Os pontos 1, 2 e 3 representam a estufagem início, fim e malte final, respetivamente.

Nos gráficos da Figura 33 verifica-se que há maior proporção dos aldeídos, n-Octanal, n-Heptanal e Decanal no malte quando a temperatura de estufagem é 75°C. O que está concordante com os resultados do perfil de voláteis dos lotes F e G que contêm uma maior quantidade de aldeídos, em termos de percentagem, quando comparados com os lotes C e D. No que respeita ao efeito do processo de estufagem, há na generalidade, um aumento acentuado dos compostos 3-metilbutanal, 3-(Metiltio)propanal e (E)-2-Nonenal da estufagem início para a estufagem fim e um decréscimo dos mesmos da estufagem fim para o malte final. Verifica-se que o composto (E)-2-Nonenal com uma estufagem de 85°C diminui ligeiramente da estufagem início para a estufagem fim e aumenta acentuadamente da estufagem fim para o malte final. No perfil de voláteis já não se verifica exatamente o mesmo, pois na maior parte dos lotes (C, E e F) o teor de aldeídos aumenta ligeiramente da estufagem início para a estufagem fim e tende a manter o mesmo valor da estufagem fim no malte final. O lote C tende a aumentar o teor de aldeídos ao longo das estufagens e o lote G diminui muito ligeiramente da estufagem início para a estufagem fim e tende a aumentar da estufagem fim para o malte final.

No que respeita ao efeito da temperatura e do processo de estufagem nas cetonas do malte da variedade *Tipple* os resultados da ANOVA TWO WAY resumem-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Efeito da temperatura e processo de estufagem nas cetonas da variedade *Tipple*.

Compostos	Efeito da temperatura		Efeito do processo de estufagem	
	F	p	F	p
Acetona	2,042	0,279	1,476	0,160
3-Metil-2-butanona	0,597	0,115	2,959	0,284
2,3-Butanediona	0,018	0,052	0,460	0,082
2-Butanona	1,360	0,201	4,519	0,414
2-Pentanona	1,249	0,189	0,671	0,097
3-Hidroxi-2-butanona	0,044	0,055	10,423	0,779
2-Heptanona	1,461	0,213	13,262	0,874
6-Metil-5-hepten-2-ona	6,374	0,678	0,737	0,102
2-Octanona	9,228	0,830	4,892	0,444
3,5-Octadien-2-ona	0,092	0,060	6,612	0,571
2-Decanona	2,764	0,358	0,405	0,078
2-Undecanona	1,309	0,196	1,930	0,198

Tal como se pode verificar na Tabela 14 no malte da variedade *Tipple* as cetonas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao longo da estufagem nas duas temperaturas.

Finalmente avaliou-se o efeito da temperatura e do processo de estufagem no malte da variedade *Tipple* para álcoois, os resultados apresentam-se na Tabela 15 e na Figura 34.

Tabela 15 - Resultados da ANOVA TWO-WAY do efeito da temperatura e do processo de estufagem nos álcoois do malte da variedade *Tipple*.

Compostos	Efeito da temperatura		Efeito do processo de estufagem	
	F	p	F	p
Etanol	1,053	0,314	0,058	0,944
2-Metil-1-propanol	1,358	0,254	1,323	0,284
1-Butanol	0,104	0,750	0,098	0,907
1-Penten-3-ol	0,963	0,335	2,754	0,082
3-Metil-1-butanol	0,397	0,534	1,826	0,181
2-Metil-1-butanol	1,221	0,279	0,855	0,437
1-Pentanol	0,650	0,427	1,392	0,267
2,3-Butanediol	10,518	0,003	1,426	0,258
1-Hexanol	4,165	0,052	2,911	0,072
1-Heptanol	2,712	0,112	1,828	0,181
1-Octen-3-ol	0,434	0,516	0,579	0,567
2-Etil-1-hexanol	0,794	0,381	0,036	0,965
Benzenoetanol	2,741	0,110	2,944	0,070
1-Nonanol	6,988	0,014	1,221	0,311
2-(2-Butoxietoxi)etanol	1,032	0,319	5,046	0,014
1-Octanol	11,881	0,002	0,260	0,773

Na Tabela 15 observa-se que os compostos 2,3-Butanediol, 1-Nonanol e o 1-Octanol apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o efeito da temperatura e o composto 2-(2-Butoxietoxi)etanol obteve diferenças significativas no efeito do processo de estufagem.

A Figura 34 mostra os compostos 2,3-Butanediol, 1-Nonanol 1-Octanol e 2-(2-Butoxietoxi)etanol que apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o efeito da temperatura e/ou o efeito do processo de estufagem.

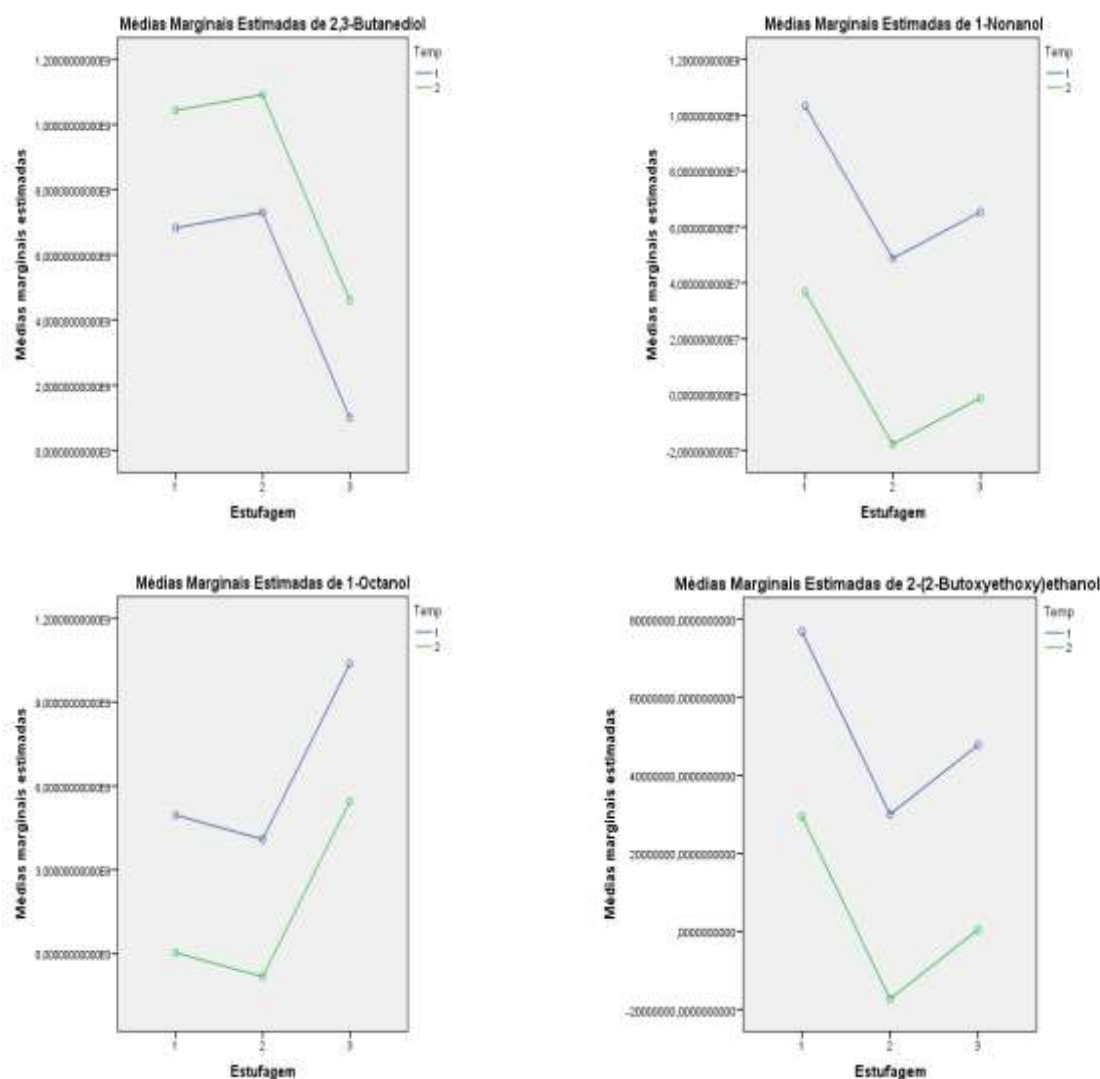


Figura 34 - Álcoois- 2,3-Butanediol, 1-Nonanol e 1-Octanol com diferença estatisticamente significativa no efeito da temperatura e 2-(2-Butoxi)etanol com diferenças no efeito do processo de estufagem em que a linha 1 representa a temperatura de 85°C e a linha 2 representa a temperatura de 75°C. Os pontos 1, 2 e 3 representam a estufagem início, fim e malte final, respectivamente.

Nos gráficos da Figura 34, observa-se na generalidade, uma diminuição dos álcoois do início da estufagem para o malte final apresentando maior quantidade de álcoois o malte que teve temperatura de estufagem de 85°C, exceto para o composto 2,3-Butanediol que tem uma maior formação com a temperatura de estufagem de 75°C. Relativamente ao efeito do processo de estufagem, verifica-se que o composto 2-(2-Butoxi)etanol tende a diminuir acentuadamente da estufagem início para a estufagem fim e a aumentar da estufagem fim para o malte final. Comparativamente ao perfil de voláteis verifica-se, na generalidade, que nos lotes C, D e F o teor de álcoois

tende a diminuir da estufagem início para a estufagem fim e a aumentar da estufagem fim para o malte final. O mesmo não se verifica para os lotes F e G, pois o teor de álcoois foi sempre diminuindo ao longo das estufagens. Comparando a composição do malte das duas variedades de cevada (*Quench* e *Tipple*) verificou-se que apresentavam um perfil qualitativo semelhante no que respeita aos compostos responsáveis pelo *flavour*. O malte da variedade *Tipple* apresentou mais 5 aldeídos e 2 cetonas que o malte da variedade *Quench*, mas no geral a evolução foi semelhante do início para o fim da estufagem os aldeídos relevantes para o odor aumentaram, diminuindo ligeiramente no malte final e os álcoois com impacto no odor diminuíram do início para o fim da estufagem e depois aumentaram ligeiramente no malte final. As cetonas identificadas nos 2 tipos de malte foram as mesmas e não apresentaram diferenças significativas.

3.4 Quantificação do DMS nas amostras de malte *pilsen* provenientes da minimaltaria

Na última fase do presente trabalho, efetuou-se a quantificação do DMS dos 7 lotes de malte provenientes da minimaltaria mais um lote que foi entregue mais tarde, isto porque o DMS é um composto de enxofre que se estiver em excesso contribui para a formação de *off-flavours* da cerveja. Em baixos níveis pode ser benéfico, pois pode contribuir positivamente para o aroma e paladar da cerveja. Em altos níveis pode ser causa de um poderoso aroma desagradável, a vegetal cozido ou a couve (Scarlata & Ebeler, 1999).

O DMS foi analisado pela técnica de HS-SPME/GC-MS. Foram pesados 3g de amostra num vial de 15 ml e foi adicionado à amostra 15 µl de EMS (padrão interno). Nesta fase foi usado mais um lote de cevada da variedade *Tipple* denominado por lote H cuja humidade é inferior aos restantes lotes e possui uma temperatura de estufagem de 85°C. Os testes foram feitos em duplicado e foi usado o modo de iões selecionados - “SIM” onde foram selecionados iões moleculares alvo para o DMS (62) e para o EMS (61) (Figura 35). Os valores das concentrações finais foram calculados em µg/kg.

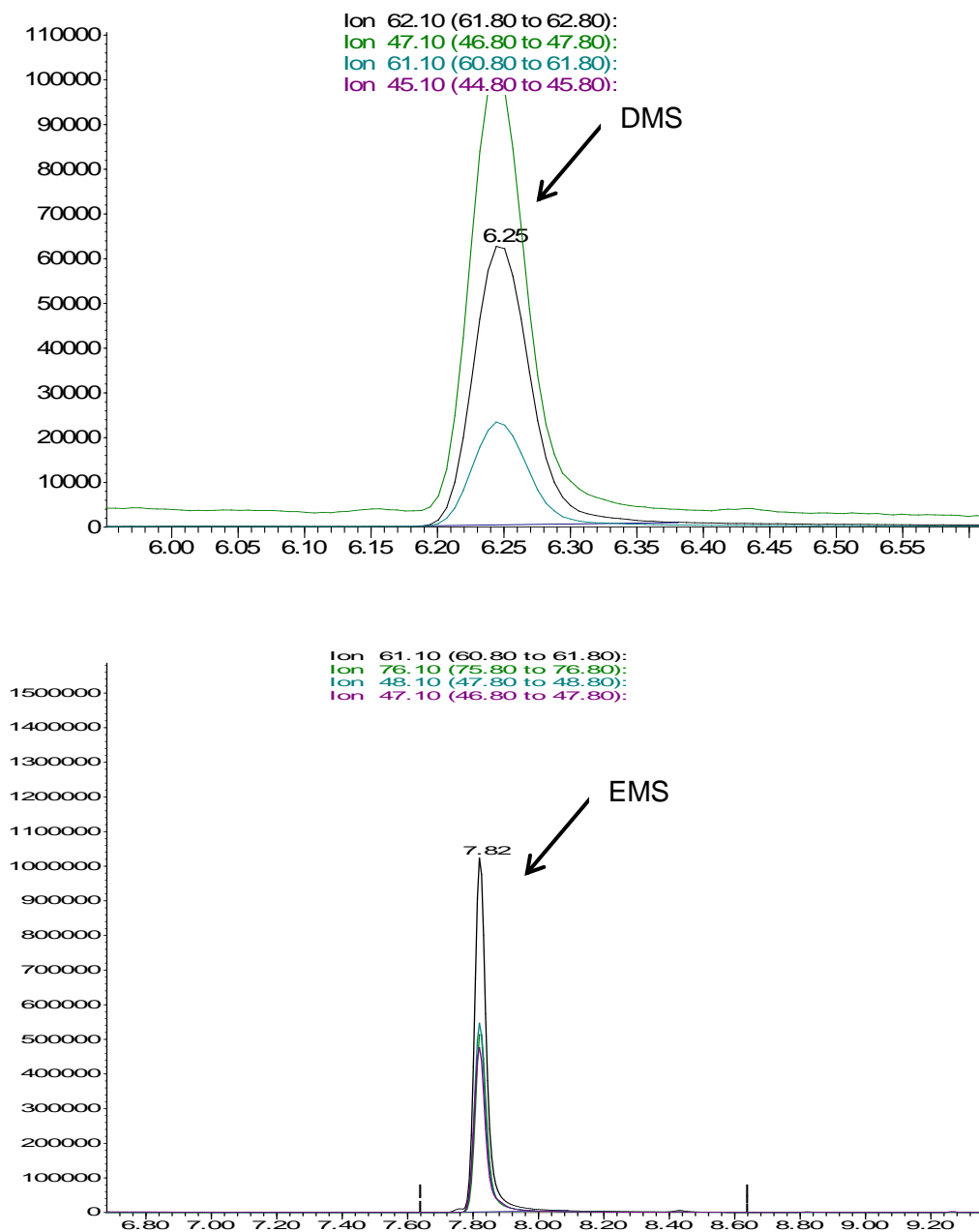
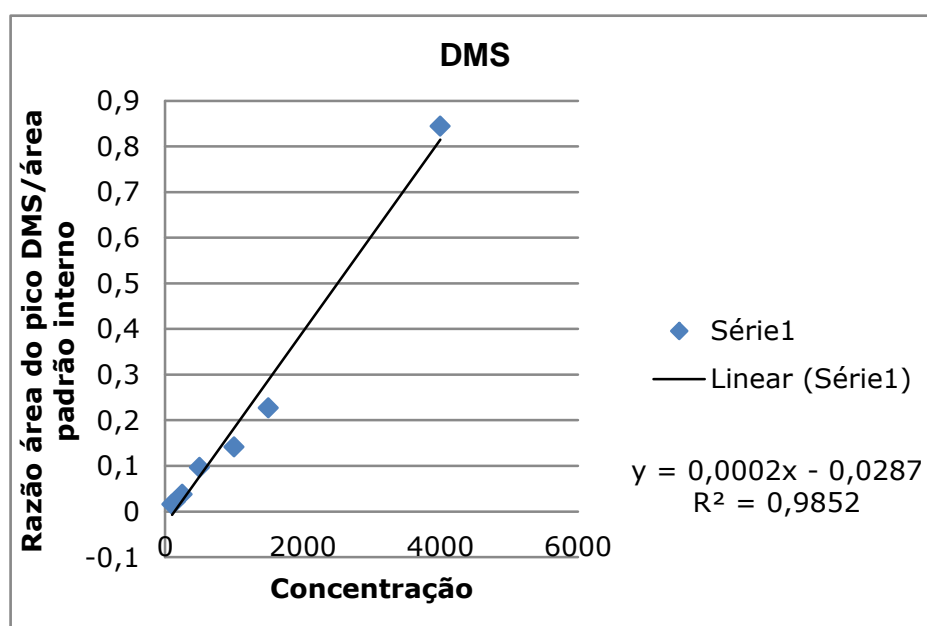


Figura 35 – Iões moleculares alvo para o DMS (62) e para o EMS (61) e respetivo tempo de retenção.

A curva de calibração para a quantificação do DMS foi feita com 7 padrões com concentrações de 100, 150, 250, 500, 1000, 1500 e 4000 $\mu\text{g/Kg}$. Na Tabela 16 e na Figura 36 apresentam-se os resultados da elaboração da curva de calibração apresentando-se a razão da área do DMS/área do padrão interno vs. concentração.

Tabela 16 - Resultados da curva de calibração.

Padrões	Concentração final µg/Kg	Razão da área DMS/área padrão interno
1	100	0,015369
2	150	0,021564
3	250	0,036925
4	500	0,09592
5	1000	0,140973
6	1500	0,226393
7	4000	0,843998

**Figura 36** - Curva de calibração para o DMS.

A exatidão do método foi avaliada por fortificação com quantidades conhecidas de DMS em dois níveis de concentração. A recuperação é definida como a quantidade da substância com interesse analítico adicionada na toma do material teste, que vai ser extraída e quantificada (Ribani *et al.*, 2004). Foram feitas 6 análises cromatográficas, preparadas com a solução de DMS a 10 mg/L e com a amostra “estufagem final do lote A”. Foram preparados e analisados 3 *vials* com uma concentração final de 50 µg/Kg de DMS e os restantes 3 *vials* com uma concentração final de 150 µg/Kg. Aos 6 preparados

foi adicionada uma quantidade de 15 µl de EMS (padrão interno). A Tabela 17 resume os resultados referentes à recuperação.

Tabela 17 - Resultados dos ensaios de recuperação (n=6).

Amostra	Valor obtido (µg/kg)	Valor real (µg/kg)	Recuperação (%)
Estufagem fim lote	2449,01	2485,048	99
A	2515,711	2585,048	97

De acordo com a Tabela 17 pode-se verificar que com uma concentração de 50 µg/Kg houve uma recuperação de 99% e com uma concentração de 150 µg/Kg houve uma recuperação de 97%, ou seja, as taxas de recuperação são próximas de 100% o que significa que houve uma boa taxa de recuperação com o método aplicado.

As concentrações referentes à quantificação do DMS dos 8 lotes encontram-se representadas na Tabela 18.

Tabela 18 - Média, desvio padrão, coeficiente de variação e concentração final do DMS em 8 lotes de cevada submetida ao processo de minimaltaria.

Nome da amostra	Estufagens	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	[DMS] µg/kg
Lote A	Estufagem início	0,1017	0,008809	8,661478	652
	Estufagem fim	0,077486	0,007441	9,602498	531
	Malte final	0,387337	0,034274	8,848513	2080
Lote B	Estufagem início	0,306583	0,09275	30,25291	1676
	Estufagem fim	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Malte final	0,079781	0,00564	7,069484	1750
Lote C	Estufagem início	0,12831	0,006186	4,821289	656
	Estufagem fim	0,170311	0,00949	5,572399	995
	Malte final	0,14943	0,016164	10,81686	890
Lote D	Estufagem início	0,118317	0,004973	4,20271	735
	Estufagem fim	0,147184	0,008359	5,679528	879
	Malte final	0,00148	0,000165	11,16479	150
Lote E	Estufagem início	0,103493	0,004458	4,30723	660
	Estufagem fim	0,142547	0,004879	3,423067	856
	Malte final	0,733246	0,005019	0,684436	3810
Lote F	Estufagem início	0,223127	0,058777	26,34224	1259
	Estufagem fim	0,15573	0,049281	31,64515	922
	Malte final	0,418573	0,014899	3,559458	2236
Lote G	Estufagem início	0,147181	0,011775	8,000217	879
	Estufagem fim	0,225839	0,014386	6,369983	1272
	Malte final	0,120327	0,012859	10,68638	745
Lote H	Estufagem início	0,06314	0,004946	7,833827	459
	Estufagem fim	0,074694	0,005547	7,426523	517
	Malte final	0,070579	0,004	5,667325	496

De acordo com a Tabela 18, verificou-se que existem grandes oscilações no teor de DMS.

Nos lotes A e B (variedade *Quench*) verificou-se que há uma diminuição da concentração do DMS da estufagem início para a estufagem fim e um aumento da estufagem fim para o malte final. Não se detetou DMS no lote B no final da estufagem. Nos lotes A e B há uma diminuição da concentração da estufagem início para a estufagem fim com concentrações de 652 µg/kg para 531 µg/kg e de 1676 µg/kg para não detetado, respetivamente e verifica-se um aumento da concentração da estufagem fim para o malte final com concentrações de 531 µg/kg para 2080 µg/kg e de não detetado para 1750 µg/kg.

Nos lotes C, D, E, F, G e H (variedade *Tipple*) já não se verificou o mesmo, ou seja, nos lotes C, D, G e H, obteve-se um aumento da concentração de DMS da estufagem início para a estufagem fim com concentrações de 656 µg/kg para 995 µg/kg, de 735 µg/kg para 879 µg/kg, de 879 µg/kg para 1272 µg/kg e de 459 µg/kg para 517 µg/kg, respetivamente e uma diminuição da concentração de DMS da estufagem fim para o malte final com concentrações de 995 µg/kg para 890 µg/kg, de 879 µg/kg para 150 µg/kg, de 1272 µg/kg para 745 µg/kg e de 517 µg/kg para 496 µg/kg, respetivamente. Para o lote E obteve-se uma concentração crescente entre as estufagens início, fim e malte final, com concentrações de 660 µg/kg, 856 µg/kg e 3810 µg/kg, respetivamente. No lote F verificou-se uma diminuição da concentração do DMS da estufagem início para a estufagem fim e um aumento da estufagem fim para o malte final, com concentrações de 1259 µg/kg, 922 µg/kg e 2236 µg/kg, respetivamente. As diferenças entre os lotes podem ter a ver não só com a variedade (*Quench* e *Tipple*), mas também com algum aspeto tecnológico que não foi controlado porque não seguem um padrão constante. No entanto, no geral, os lotes de malte com temperaturas mais baixas de estufagem apresentaram teores mais elevados de DMS. De acordo com a literatura, a formação do DMS ocorre principalmente durante a secagem e está dependente da temperatura de secagem (Coghe *et al.*, 2004; Marconi *et al.*, 2011; Gebremariam *et al.*, 2013).

Níveis elevados de DMS podem ser reduzidos pelo ajuste adequado da temperatura de secagem (Kavanagh *et al.*, 1976 e White & Wainwright, 1977). Coghe *et al.* (2004); Marconi *et al.* (2011); Gebremariam *et al.* (2013) afirmam que com um aumento da temperatura de secagem há uma diminuição significativa do ter de DMS em amostras de malte. Segundo Gebremariam *et al.* (2013) maltes com baixas temperaturas de secagem podem conter mais DMS quando comparado com temperaturas mais elevadas e que apenas uma parte do precursor inativo do DMS é convertido para precursor ativo o que poderá envolver apenas uma pequena mudança estrutural e a restante parte do precursor é destruída pelo calor (Gebremariam *et al.*, 2013).

4. Conclusões

Inicialmente começou-se por testar 2 fibras, a DVB-CAR-PDMS e a CAR-PDMS, com e sem adição de 2 ml de NaCl a 20% e com temperaturas de 50, 60 e 70 °C durante 40 minutos. Chegou-se à conclusão, através da análise das áreas cromatográficas, que as melhores condições seriam com a fibra CAR-PDMS, sem a adição de 2 ml de NaCl a 20% e a uma temperatura de 70 °C durante 40 minutos.

Posteriormente procedeu-se à análise dos compostos voláteis dos maltes especiais, nesta fase, verificou-se que tanto no 1º como no 2º lote, havia um maior número de álcoois no malte *pilsen* e no malte trigo, quando comparados com o malte caramelo e com o malte chocolate. Nos restantes dois tipos de malte (caramelo e chocolate) verificou-se que havia um maior número de compostos furânicos comparativamente ao malte *pilsen* e de trigo.

De seguida, foram analisados 7 lotes de malte produzidos em condições controladas numa minimaltaria, denominados de lotes A, B, C, D, E e F. Foram analisadas amostras das etapas “estufagem início”, “estufagem fim” e “malte final”. Os lotes A e B pertenciam à variedade *Quench* e os restantes lotes pertenciam à variedade *Tipple*. Nos lotes B, C e D foi usado um programa de maltagem *standard* com uma temperatura de estufagem de 85°C e nos restantes lotes foi usada uma temperatura de estufagem mais baixa, ou seja, 75°C em vez de 85°C. Compararam-se de uma forma global os resultados expressos em percentagem da área total e efetuou-se uma ANOVA TWO-WAY com as áreas dos aldeídos, cetonas e álcoois.

Comparando os resultados do lote A e do lote B ambos da variedade *Quench* verificou-se que com uma temperatura de estufagem de 85°C há maior proporção de aldeídos e menor proporção de álcoois. No entanto, nos restantes lotes (C e D com temperatura de estufagem de 85°C e E, F, G e H com temperatura de estufagem de 75°C) da variedade *Tipple*, este padrão não foi tão acentuado, pois na generalidade, tanto os aldeídos como os álcoois encontravam-se em maiores quantidades com a temperatura de estufagem de 75°C. Atendendo a que foram preparados mais lotes da variedade *Tipple*, as conclusões obtidas para esta variedade são mais fiáveis.

No entanto, o malte das duas variedades de cevada (*Quench* e *Tipple*) apresentou um perfil qualitativo semelhante no que respeita aos compostos responsáveis pelo *flavour*, embora no malte da variedade *Tipple* tivessem sido identificados mais 3 aldeídos e 2 cetonas que o malte da variedade *Quench*, no geral a evolução foi semelhante do início para o fim da estufagem, os aldeídos relevantes para o odor aumentaram, diminuindo ligeiramente no malte final e os álcoois com impacto no odor diminuiram do início para o fim da estufagem e depois aumentaram ligeiramente no malte final. As

cetonas identificadas nos 2 tipos de malte foram as mesmas e não apresentaram diferenças significativas.

Para a quantificação do DMS, usaram-se inicialmente as mesmas condições que para a otimização no perfil de voláteis, no entanto, verificou-se que a temperatura usada, 70°C, acabava por degradar o DMS (composto de interesse), cujo ponto de ebulição era de 37°C, então, optou-se por testar mais duas temperaturas 50 e 30°C, durante períodos de 10, 15, 20 e 30 minutos. Após os testes, verificou-se que as melhores condições seriam com uma temperatura de 30°C num período de 15 minutos, o que indicou que as condições otimizadas anteriormente para a análise do perfil de voláteis não são adequadas para extrair e dosear o DMS.

Os estudos da percentagem de recuperação do método para 2 níveis de concentração diferentes variaram entre 97 e 99%. Procedeu-se à quantificação do DMS de 8 lotes de duas variedades (*Quench* e *Tipple*) de malte *pilsen* provenientes da minimaltaria. Nesta fase foi usado mais um lote (H) além dos 7 lotes descritos anteriormente (A, B, C, D, E e F). Este último lote pertence à variedade *Tipple*, possui uma humidade inferior aos restantes lotes e teve uma temperatura de estufagem de 85°C. Verificou-se, através desta quantificação, que o teor de DMS nos 8 lotes de malte variou entre 150 – 3810 µg/kg. Verificaram-se grandes oscilações na composição em DMS ao longo da estufagem o que pode estar relacionado com algum aspeto tecnológico que não foi controlado porque as oscilações não seguem um padrão constante. No entanto, no geral, os lotes de malte com temperaturas mais baixas de estufagem apresentaram teores mais elevados de DMS o que pode comprometer a qualidade do malte.

5. Bibliografia e mediografia

Almeida, C.; Rosário, P.; Serôdio, P. & Nogueira, J.M.F.; **2004**. "Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica." Química (Boletim da Sociedade Portuguesa de Química), **95**, 69-77.

Bamforth, C.; **2003**. "Beer: tap the art and science of brewing", Oxford University Press, second edition, New York.

Bélanger, J.M.R.; Bissonnette, M.C.; Paré, J.R.J.; **1997** "Chromatography: principles and applications. in instrumental methods in food analysis". Elsevier Science B.V., Amsterdão.

Čechovská L.; Konečný M.; Velíšek J. & Cejpek K.; **2012**. "Effect of Maillard reaction on reducing power of malts and beers." Czech Journal of Food Sciences, **30**, 548-556

Cerny, C.; **2008**. "The aroma side of the Maillard reaction." Annals of the New York Academy of Sciences, **1126**, 66-71.

Chiaradia, M.C.; Collins, C.H. & Jardim, I.C.S.F.; **2008**. "O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos". Química Nova, **31**, 623-636.

Coghe, S.; D'Hollander, H.; Verachtert, H. & Delvaux, F. R.; **2005**. "Impact of dark specialty malts on extract composition and wort fermentation." Journal of the Institute of Brewing, **111**, 51-60.

Coghe, S.; Martens, E.; D'Hollander, H.; Dirinck, P.J. & Delvaux, F.R.; **2004**. "Sensory and instrumental flavour analysis of wort brewed with dark specialty malts." Journal of the Institute of Brewing, **110**, 94-103.

Cramer, A.C.; Mattinson, S.D.; Fellman, J.K. & Baik, B.K.; **2005**. "Analysis of volatile compounds from various types of barley cultivars." Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53**, 7526–7531.

Dabina-Bicka, I; Karklina, D.; Rakcejeva, T.; Sniedzane, R. & Kviesis, J.; **2010**. "The dynamics of vitamins c and e in barley products during malting." Food Sciences, **1**, 111-115.

De Schutter, D.P.; Saison, D.; Delvaux, F.; Derdelinckx, G.; Rock, J.M.; Neven, H. & Delvaux, F.R.; **2008**. "Characterization of volatiles in unhopped wort." Journal of Agricultural and Food Chemistry, **56**, 246-254.

Dong, L.; Piao, Y.; Zhang, X.; Zhao, C.; Hou, Y. & Shi, Z.; **2013**. "Analysis of volatile compounds from a malting process using headspace solid-phase micro-extraction and GC–MS." Food Research International, **51**, 783-789.

Dondelinger, R.M.; **2012**. "Gas chromatography systems". Biomedical Instrumentation & Technology, **46**, 375-379.

Escuderos, M.E.; **2011**. "Olive oil aroma evaluation by gas chromatographic method: A Critical Review." Critical Reviews in Analytical Chemistry, **41**, 70-80.

Fernandes, J.O.; **1993**. "Cromatografia gasosa / espectrometria de massa", Laboratório de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Fors, S.M. & Eriksson, C.E.; **1986**. "Pyrazines in extruded malt." Journal of the Science of Food and Agriculture, **37**, 991-1000.

Franco, L.; Sánchez, C.; Bravo, R.; Rodríguez, A.B.; Barriga, C.; Romero, E. & Cubero, J.; **2012**. "The sedative effect of non-alcoholic beer in healthy female nurses" PLoS One, **7**, 1-6.

Fritsch, H.T. & Schieberle, P.; **2005**. "Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a Bavarian Pilsner-type beer. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53**, 7544-7551.

Gebremariam, M.; Zarnkow, M. & Becker, T.; **2013**. "Effect of drying temperature and time on alpha-amylase, beta-amylase, limit dextrinase activities and dimethyl sulphide level of teff (*Eragrostis tef*) malt." Food and Bioprocess Technology, **6**, 3462-3472.

Hughes, P.; **2009**. "Identification of taste - and aroma - active compounds of beer." Beer in health and Disease Prevention, International center for brewing and destiling, Heriot-Watt University, Riccarton, Endinburgh, UK.

Hughes, P.S. & Baxter, E.D.; **2001**. "An overview of the malting and brewing processes." The Royal Society of Chemistry, In beer: quality, safety and nutritional aspects, Cambridge, UK.

Jackson, S.W., & Hudson, J.R.; **1978**. "Flavour from crystal malt." Journal of the Institute of Brewing, **84**, 34-40.

Kantola, R.; Lassila, L.V.; Tolvanen, M. & Valittu, P.K.; **2013**. "Color stability of thermochromic pigment in maxillofacial silicone." Journal of Advanced Prosthodontics, **5**, 75-83.

Kavanagh, T.E.; Derbyshire, R.C.; Hildebrand, R.P.; Clarke, B.J. & Meeker, F.J.; **1976**. "Dimethyl sulphide formation in malt - effect of malting conditions." Journal of the Institute of Brewing, **82**, 270-272.

Kobayashi, M.; Shimizu, H. & Shioya, S.; **2008**. "Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation." Journal of Bioscience and Bioengineering, **106**, 317-323.

Kruger, R.L.; Dallago, R.M.; Filho Ido, N. & Di Luccio, M.; **2009**. "Study of odor compounds in gaseous effluents generated during production of poultry feather and viscera meal using headspace solid phase microextraction." Environ Monit Assess, **158**, 1-4.7

Limure, T. & Sato, K.; **2013**. "Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding." Food Research International, **54**, 1013-1020.

Lodolo, E.J.; Kock, J.L.; Axcell, B.C. & Brooks, M.; **2008**. "The yeast *saccharomyces cerevisiae*- the main character in beer brewing." FEMS Yeast Research, **8**, 1018-1036.

Marconi, S.A.O.; Perretti, G. & Fantozzi, P.; **2011**. "Determination of dimethyl sulphide in brewery samples by headspace gas chromatography mass spectrometry (HS-GC/MS)" Italian Journal of Food Science, **23**, 19-27

Martins, S.I.F.S.; Jongen, W.M.F. & Van Boekel, M.A.J.S.; **2000**. "A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling." Trends in Food Science & Technology, **11**, 364-373.

McNair, H. M. & Miller, J. M.; **2009**. "Basic gas chromatography". Wiley-VCH, Second Edition, New York.

Nanadoum, M. & Pourquie, J.; **2009**. "Sorghum beer: production, nutritional value and impact upon human health", **5**, Laboratoire de Recherche sur les Substances Naturelles, Faculté des Sciences Exactes et Appliquées N'Djaména, Tchad; UMR Microbiologie et Génétique Moléculaire, CNRS/INA-PG/INRA, CBAI, Thiverval-Grignon, France.

Niki, T.; Fujinaga, T.; Watanabe, M.F. & Kinoshita, J.; **2004**. "Simple determination of dimethylsulfide (DMS) and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Oceanography, **60**, 913-917.

Nikolić, D., & Van Breemen, R.B.; **2013**. "Analytical methods for quantitation of prenylated flavonoids from hops." Current Analytical Chemistry, **9**, 71-85.

Nunes, C.S. & Baptista, A.O.; **2001**. "Implicações da reacção de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos." Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias **96**, 53-59.

Nursten H.; **2005**. "The Maillard Reaction: Chemistry, biochemistry and Implications." :The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Oliveira, M.A.B.; **2009**. "Cerveja: análise sensorial e fabricação". Noryam editora, Cachoeiro de Itapemirim, Brasil.

O'Rourke, T.; **2002^a**. "The function of wort boiling"; The Brewer International, 17-19.

O'Rourke, T.; **2003^b**. "Hops and hop products." The Brewer International, **3**, 21-25.

Pavslar, A. & Buiatti, S.; **2009^a**. "Non-lager beer" Beer in Health and Disease Prevention," **2**, Department of Food Science, University of Udine.Udine, Italy.

Pavslar, A. & Buiatti, S.; **2009^b**. "Lager beer" Beer in Health and Disease Prevention." **3**, Department of Food Science, University of Udine.Udine, Italy.

Pawliszyn, J.; **1997**. "Solid phase microextraction: Theory and practice".Wiley-VHC; New York, NY.

Pinho, O.; Ferreira, I.M. & Santos, L.H.; **2006**. "Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction." Journal of Chromatography A, **21**, 145-153.

Pinto, M.M.M.; **2011**. "Manual de trabalhos laboratoriais de química orgânica e farmacêutica." Lidel Edições Técnicas, Lisboa - Porto, Portugal.

Priest, F G. & Stewart, G.G.; **2006**. "Handbook of Brewing" Taylor & Francis Group LLC CRC Press, second edition, United States of America.

Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. & Melo, L.F.C.; **2004**. "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos." Química Nova, **27**, 771-780.

Rainieri, S.; **2009**. "The brewer's yeast genome: from its origins to our current knowledge" **8**, Department of Agricultural Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Reggio Emilia, Italy.

Scarlata, C.J. & Ebeler, S.E.; **1999**. "Headspace solid-phase microextraction for the analysis of dimethyl sulfide in beer." Journal of Agricultural and Food Chemistry, **47**, 2505-2508.

Scherb, J.; Kreissl, J.; Haupt, S. & Schieberle, P.; **2009**. "Quantitation of S-methylmethionine in raw vegetables and green malt by a stable isotope dilution assay using LC-MS/MS: comparison with dimethyl sulfide formation after heat treatment." Journal of Agricultural and Food Chemistry, **57**, 9091-9096.

Soares, E.V.; **2009**. "Flocculation in *saccharomyces cerevisiae*", **9**, Chemical engineering, Superior Institute of Engineering from Porto, Portugal; IBB-Institute from Biotechnology and Bioengineering, Center for Biological Engineering, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

Shibao, J. & Bastos, D.H.M.; **2011**. "Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde." Revista de Nutrição, **24**, 895-904.

Tarjoc, F.C. & Tabara, V.; **2011**. "Research concerning some qualitative elements of winter barley for beer industry." Research Journal of Agricultural Science, **43**, 179-183.

Tranchida, P.Q.; Franchina, F.A.; Dugo, P. & Mondello, L.; **2014**. "Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: Recent evolution and current trends." Mass Spectrometry Reviews, 1-11.

Unicer^a.; **2012**. "Ficha técnica, matéria-prima, malte chocolate", 1-4, Porto, Portugal.

Unicer^b.; **2012**. "Ficha técnica, matéria-prima, malte caramelo", 1-5, Porto, Portugal.

Unicer^c.; **2012**. "Ficha técnica, matéria-prima, malte pilsen", 1-8, Porto, Portugal.

Unicer^d.; **2012**. "Ficha técnica, matéria-prima, malte Trigo", 1-5, Porto, Portugal.

Valente, A.L.P. & Augusto, F.; **2000**. "Microextração por fase sólida. Química Nova, **23**, 523-530.

Vandecan, S.M.; Saison, D.; Schoupe, N.; Delvaux, F. & Delvaux, F.R.; **2010**. "Optimisation of specialty malt volatile analysis by headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry." Analytica Chimica Acta, **671**, 55-60.

Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Coghe, S.; Verstrepen, K.J.; Verachtert, H. & Derdelinckx, G.; **2003**. "Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer." Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51**, 6782-6790.

Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verachtert, H. & Derdelinckx, G.; **2006**. "The chemistry of beer aging - a critical review." Food Chemistry, **95**, 357-381.

Vazquez-Landaverde, P.A.; Torres, J.A. & Qian, M.C.; **2006**. "Quantification of trace volatile sulfur compounds in milk by solid-phase microextraction and Gas chromatography-pulsed flame photometric detection." Journal of Dairy Science, **89**, 2919-2927.

Verstrepen, K.J.; Derdelinckx, G.; Verachtert, H. & Delvaux, F.R.; **2003**. "Yeast flocculation: what brewers should know." Applied Microbiology and Biotechnology, **61**, 197-205.

Weiss, E. & Zohary, D.; **2011**. "The Neolithic Southwest Asian Founder Crops: Their Biology and Archaeobotany." Current Anthropology, **52**, S237-S254.

White, F.H. & Wainwright, T.; **1977**. "The presence of two dimethyl sulphide precursors in malt, their control by malt kilning conditions, and their effect on beer DMS levels." Journal of the Institute of Brewing, **83**, 224-230.

Wunderlich, S. & Back, W.; **2009**. "Overview of manufacturing beer:ingredients, process, and quality criteria" Beer in Health and Disease Prevention, **1**, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Freising-Weihenstephan, Germany.

Xiao, Z.; Dai, S.; Niu, Y.; Yu, H.; Zhu, J.; Tian, H. & Gu, Y.; 2011. "Discrimination of chinese vinegars based on headspace solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry of volatile compounds and multivariate analysis." Journal of Food Science, **76**, C1125-1135.

Yahya, H.; Linforth, R.S.T. & Cook, D.J.; **2014**. "Flavour generation during commercial barley and malt roasting operations: A time course study." Food Chemistry, **145**, 378-387.

<http://veja.abril.com.br/saladeaula/140909/a-loira-que-vem-do-fungo.shtml> (Acedido em 29/04/2014)

<http://pt.malteurop.com/os-nossos-dominios/maltes/do-malte-a-cerveja> (Acedido em 30/04/2014).

<http://www.gruit.es/pt/el-llupol-recolzat-per-una-moda/> (Acedido em 05/05/2014).

http://comofazercerveja.com.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=14#lupulo (Acedido em 05/05/2014)

<http://www.sindicerv.com.br> (Acedido em 16/06/2014)

<http://www.pickards.co.uk/farming/249/Spring-Varieties.aspx> (Acedido em 13/06/2014)

[http://www.goldcrop.ie/images/Spring%20Barley%20Recommended%20List%202014\(1\).pdf](http://www.goldcrop.ie/images/Spring%20Barley%20Recommended%20List%202014(1).pdf) (Acedido em 13/06/2014).

http://www.hutton.ac.uk/research/groups/cell-and-molecular_sciences/rhynchosporium-barley, (Acedido em 13/06/2014)

http://agrogestao.com/ficheiros/Maltiberica_Manual_Boas_Praticas_Agricolas_web.pdf, (Acedido em 02/09/2014)